

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS DOCTORAL**

**Desarrollo de anticuerpos monoclonales frente a *Nosema ceranae* como  
aportación al diagnóstico del síndrome de despoblamiento**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA**

**PRESENTADA POR**

**Carmen Fernández Vadillo**

Directores

Carmen del Águila de la Puente  
Fernando Izquierdo Arias

**Madrid, 2014**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE  
FACULTAD DE CC. BIOLÓGICAS



**DESARROLLO DE ANTICUERPOS MONOCLONALES  
FRENTA A *Nosema ceranae* COMO APORTACIÓN  
AL DIAGNÓSTICO DEL SÍNDROME DE  
DESPOBLAMIENTO DE LAS COLMENAS.**

**TESIS DOCTORAL**

**CARMEN FERNÁNDEZ VADILLO**

**Madrid, 2014**



UNIVERSIDAD SAN PABLO CEU  
FACULTAD DE FARMACIA



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE  
FACULTAD DE CC. BIOLÓGICAS



UNIVERSIDAD SAN PABLO-CEU  
FACULTAD DE FARMACIA



# **DESARROLLO DE ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A *Nosema ceranae* COMO APORTACIÓN AL DIAGNÓSTICO DEL SÍNDROME DE DESPOBLAMIENTO DE LAS COLMENAS.**

**Memoria presentada por Dña. Carmen Fernández Vadillo  
para optar al grado de Doctor.**

Vº Bº Directora

VºBº Director

Dra. Carmen del Águila.

Dr. Fernando Izquierdo.

Carmen Fernández.

**Madrid, 2014.**



## AGRADECIMIENTOS

*Quisiera expresar mi agradecimiento a todas las personas que directa o indirectamente han ayudado a la elaboración de esta tesis doctoral, y en especial:*

*A la Dra. D<sup>a</sup> Carmen del Águila de la Puente, codirectora de la tesis, por haber permitido mi iniciación en la investigación y haber confiado en mí para la realización de este trabajo.*

*A Fernando (Dr. Izquierdo Arias), codirector de la tesis (y gran amigo a pesar de ello), que desde el principio me ayudó sin reservas y que me ha enseñado tanto, dentro y fuera del laboratorio. Sin tu ayuda este trabajo no habría salido adelante, muchas gracias (te debo unos cuantos cafés!).*

*A la Dra. Raquel Martín, al Dr. Mariano Higes y a Encarna Garrido del Centro Apícola Regional, por su colaboración en el desarrollo del trabajo.*

*A Chema, del animalario y a Santiago, del departamento de estadística, por su ayuda, su interés y su amabilidad en todo momento.*

*A mis compañeros y amigos del CEU (los que están y los que han pasado):*

*Marisol, por enseñarme de ciencia y de paciencia (y también un poco de diplomacia). Que sepas que esta tesis va en tapa dura por tí, y solo por tí.*

*Sergio, por acompañarme durante horas y horas en cultivos, enseñándome prácticamente todo lo que sé en este área, siempre con una sonrisa.*

*Mis chicas del laboratorio (Ana Luz, Ángela, Carola, Loli, Cris, Elia...), técnicos en prácticas (Margui, Pepelu, La Machine, Bilbo...), "visitantes paseantes" (Sonia, Regina, Thiago, Kate, Gisela...) y gente de otros laboratorios como los Bioquímicos (Julio y sus Marías, Javi...Angélica, te meto aquí, soy una romántica!) y los Vegetales (Elena, Cherry, Alfonso...).*

*Muchas gracias a todos por darme la mejor compañía en los buenos ratos y por vuestra ayuda y consejo en los malos. ¡Os voy a echar muchísimo de menos!*

*A Mila, Mirian, Lola, Fer, Blanca, Vane, Sergio, Santi, Coti... mi familia adoptiva desde hace ya unos añitos, y los mejores espejos en los que mirarse para llegar a ser todo lo que se quiera ser en la vida.*

*A mi tío Emilio, editor de lujo de este trabajo.*

*Y por último, y sobre todo, a mis padres, a mi hermano y a Borja, por su cariño y apoyo constante e incondicional.*



## A. ÍNDICE GENERAL.

	Pág.
A. INDICE GENERAL.	7
B. INDICE DE TABLAS.	14
C. LISTA DE ABREVIATURAS.	18
I. RESUMEN.	23
II. SUMMARY.	25
1. INTRODUCCIÓN.	31
1.1. ANTECEDENTES.	31
1.2. MICROSPORIDIOS.	32
1.2.1. TAXONOMÍA DE LOS MICROSPORIDIOS.	32
1.2.1.1. Filogenia de <i>N. ceranae</i> y <i>N. apis</i> .	33
1.2.2. ORGANIZACIÓN CELULAR DE LOS MICROSPORIDIOS.	34
1.2.2.1. Forma vegetativa de los microsporidios.	34
a) <u>Forma vegetativa de <i>N. ceranae</i>.</u>	35
1.2.2.2. La espora: forma de resistencia de los microsporidios.	36
a) <u>Forma de resistencia de <i>N. ceranae</i>.</u>	38
1.2.3. CICLO BIOLÓGICO DE LOS MICROSPORIDIOS.	38
1.2.3.1. Ciclo biológico de <i>N. ceranae</i> .	41
1.2.4. EPIDEMIOLOGÍA DE LOS MICROSPORIDIOS.	42
1.2.4.1. Epidemiología de <i>N. ceranae</i> y <i>N. apis</i> .	42
1.2.5. MECANISMOS DE TRANSMISIÓN DE LOS MICROSPORIDIOS.	44
1.2.5.1. Mecanismos de transmisión de <i>N. ceranae</i> y <i>N. apis</i> .	45
1.2.6. PATOLOGÍA Y PATOGÉNESIS DE LOS MICROSPORIDIOS.	46
1.2.6.1. Patología y patogénesis de <i>N. ceranae</i> y <i>N. apis</i> .	47
a) Virulencia de la infección.	48
b) Estacionalidad de la infección.	51
c) Patología en la colonia.	51
1.2.6.2. El síndrome de despoblamiento de las colmenas y sus posibles causas.	54
1.2.7. INTERCCIÓN PARÁSITO-HOSPEDADOR: RESPUESTA INMUNOLÓGICA.	58
1.2.8. MÉTODOS DE DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE MICROSPORIDIOS.	60
1.2.8.1. Microscopía óptica.	61
1.2.8.2. Microscopía electrónica.	65



1.2.8.3.	Técnicas inmunológicas.	65
1.2.8.4.	Técnicas moleculares.	71
1.2.8.5.	Cultivos celulares.	73
1.2.8.6.	Técnicas complementarias.	74
	a) Proteómica.	74
	b) Citometría de flujo.	75
1.2.8.7.	Diagnóstico diferencial de <i>N. ceranae</i> y <i>N. apis</i> .	75
1.2.9.	CONTROL Y TRATAMIENTO DE LA NOSEMOSIS.	78
1.3.	<u>PRINCIPIOS BÁSICOS DE LA OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.</u>	80
1.3.1.	FASES EN LA OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.	81
1.3.1.1.	Inmunización.	83
1.3.1.2.	Líneas de mieloma utilizadas en la producción de hibridomas.	85
1.3.1.3.	Fusión celular.	86
1.3.1.4.	Mantenimiento y selección de los productos de fusión.	87
1.3.1.5.	Cribado de los híbridos secretores.	90
1.3.1.6.	Clonaje de los híbridos específicos.	90
1.3.1.7.	Producción de anticuerpos monoclonales en elevadas concentraciones.	91
1.3.1.8.	Conservación de hibridomas y de anticuerpos monoclonales.	93
1.3.2.	TECNOLOGÍAS APLICADAS EN LA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.	93
1.3.2.1.	Quimerización y humanización de anticuerpos monoclonales.	94
1.3.2.2.	Presentación de los anticuerpos en la superficie de fagos ( <i>Phage-Display</i> ).	95
1.3.2.3.	Tecnología del Ribosoma <i>Display</i> ( <i>Ribosome Display</i> )	96
1.3.2.4.	Nuevas estrategias para la producción de anticuerpos monoclonales.	97
1.3.2.5.	Bibliotecas de anticuerpos.	97
1.3.3.	TECNOLOGÍAS PARA LA MEJORA DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.	98
1.3.4.	ANTICUERPOS MONOCLONALES TERAPÉUTICOS.	99
2.	<b>OBJETIVOS.</b>	103
3.	<b>MATERIAL Y MÉTODOS.</b>	105
3.1.	<u>OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES FRENTE A <i>N. ceranae</i> Y <i>N. apis</i>.</u>	105
3.1.1.	MATERIAL BIOLÓGICO.	105

3.1.1.1.	Esporas.	105
3.1.1.2.	Modelo animal.	105
3.1.1.3.	Muestras de colmenas.	106
3.1.2.	MÉTODOS.	106
3.1.2.1.	Purificación y tratamiento de las esporas.	106
	a) Tamizado.	106
	b) Purificación.	106
	c) Tratamiento.	107
3.1.2.2.	Protocolos de inmunización y sangrado del modelo animal.	107
3.1.2.3.	Procesado de la sangre para la obtención del suero policlonal.	108
3.1.2.4.	Titulación de los sueros policlonales.	108
	a) IFI para la titulación de los sueros policlonales.	109
3.1.2.5.	Estudio de reacciones cruzadas de los sueros policlonales.	109
	a) IFI para el estudio de reacciones cruzadas frente a la especie heteróloga de <i>Nosema</i> .	109
	b) IFI para el estudio de reacciones cruzadas frente a otros géneros de microsporidios.	110
3.1.2.6.	Diagnóstico de <i>N. ceranae</i> utilizando los anticuerpos policlonales.	110
	a) Tratamiento de las muestras de colmenas.	110
	b) IFI para el diagnóstico de <i>N. ceranae</i> utilizando los anticuerpos policlonales.	111
3.1.2.7.	Análisis estadístico de los resultados.	111
3.2.	<u>OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A <i>N. ceranae</i>.</u>	112
3.2.1.	MATERIAL BIOLÓGICO.	112
3.2.1.1.	Esporas.	112
3.2.1.2.	Líneas celulares.	112
3.2.1.3.	Modelo animal.	112
3.2.2.	MÉTODOS.	113
3.2.2.1.	Purificación y tratamiento de las esporas.	113
3.2.2.2.	Obtención de antígeno soluble de espора.	113
	a) Valoración de la concentración de proteínas.	114
3.2.2.3.	Obtención de anticuerpos monoclonales <i>in vitro</i> .	114
	a) Protocolos de inmunización y sangrado del modelo animal.	114

a.1)	Procesado de la sangre para la obtención del suero policlonal.	115
a.2)	Titulación de los sueros policlonales.	115
a.2.1.)	<u>IFI para la titulación de los sueros policlonales.</u>	116
b)	Protocolo de fusión celular.	116
b.1)	Crecimiento y mantenimiento del mieloma.	116
b.2)	Obtención de timocitos como medio de expansión de clones.	116
b.3)	Fusión celular (mieloma-linfocito).	117
b.4)	Mantenimiento y selección de los productos de fusión.	118
b.4.1)	<u>Selección de los híbridos secretores.</u>	119
b.4.1.1)	ELISA para la selección de híbridos secretores.	119
b.4.1.2)	IFI para la selección de híbridos secretores.	120
b.5)	Clonaje por dilución límite de los híbridos seleccionados.	120
b.6)	Expansión de clones y congelación de células.	120
b.7)	Obtención de sobrenadantes saturados de anticuerpos monoclonales.	121
3.2.2.4.	Producción de anticuerpos monoclonales <i>in vivo</i> .	121
3.3.	<u>CARACTERIZACIÓN DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES OBTENIDOS FRENTE A <i>Nosema</i> spp.</u>	121
3.3.1.	MATERIAL BIOLÓGICO.	121
3.3.1.1.	Esporas.	122
3.3.2.	MÉTODOS.	122
3.3.2.1.	Isotipado de los anticuerpos monoclonales.	122
3.3.2.2.	Purificación y tratamiento de las esporas.	122
3.3.2.3.	Titulación de sobrenadantes saturados y ascitis de los anticuerpos monoclonales.	122
3.3.2.4.	Estudio de reacciones cruzadas de los anticuerpos monoclonales.	123
a)	IFI para el estudio de reacciones cruzadas frente a la especie heteróloga de <i>Nosema</i> .	123
b)	IFI para el estudio de reacciones cruzadas frente a otros géneros de microsporidios.	123
3.3.2.5.	Obtención de antígeno soluble de espora.	124
a)	Valoración de la concentración de proteínas.	124

3.3.2.6.	Caracterización antigénica de <i>N. ceranae</i> y <i>N. apis</i> mediante electroforesis en geles de poliacrilamida 12 - 15 %, SDS-PAGE.	125
a)	Tratamiento de la muestra.	125
b)	Electroforesis.	125
c)	Tinción de plata para geles de poliacrilamida.	126
d)	Determinación de perfiles proteicos.	127
3.3.2.7.	Determinación de perfiles de inmunorreconocimiento de los anticuerpos monoclonales mediante inmunoelectrotransferencia ( <i>Western Blot</i> ).	127
a)	Electroforesis.	127
b)	Bloqueo de la membrana.	127
c)	Inmunorreconocimiento de perfiles antigénicos.	127
3.4.	<u>EVALUACIÓN DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES EN EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE <i>N. ceranae</i> Y <i>N. apis</i>.</u>	128
3.4.1.	MATERIAL BIOLÓGICO.	128
3.4.1.1.	Muestras de colmenas.	128
3.4.1.2.	Anticuerpo policlonal.	129
3.4.1.3.	Anticuerpos monoclonales.	129
3.4.2.	MÉTODOS.	129
3.4.2.1.	Tratamiento de las muestras de colmenas.	129
3.4.2.2.	IFI para el diagnóstico diferencial de <i>N. ceranae</i> y <i>N. apis</i> .	129
3.4.2.3.	Análisis estadístico de los resultados.	130
4.	<b>RESULTADOS.</b>	131
4.1.	<u>OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES FRENTE A <i>N. ceranae</i> Y <i>N. apis</i>.</u>	131
4.1.1.	OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES.	131
4.1.1.1.	Purificación y tratamiento de las esporas.	131
4.1.1.2.	Titulación de los sueros policlonaes.	132
4.1.1.3.	Estudio de reacciones cruzadas.	133
a)	IFI para el estudio de reacciones cruzadas frente a la especie heteróloga de <i>Nosema</i> .	133
b)	IFI para el estudio de reacciones cruzadas frente a otros géneros de microsporidios.	134
4.1.1.4.	Diagnóstico de <i>N. ceranae</i> utilizando los anticuerpos policlonaes.	134
4.1.1.5.	Análisis estadístico de los resultados.	140

a)	Especificidad y sensibilidad de la técnica de IFI con los anticuerpos policlonales frente a <i>N. ceranae</i> .	141
4.2.	<u>OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A <i>N. ceranae</i>.</u>	142
4.2.1.	OBTENCIÓN DE ANTÍGENO SOLUBLE DE ESPORA. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEINAS.	142
4.2.2.	INMUNIZACIÓN Y SANGRADO DEL MODELO ANIMAL.	143
4.2.2.1.	Titulación de los sueros policlonales.	143
a)	IFI para la titulación de los sueros policlonales.	143
4.2.3.	PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES <i>in vitro</i> .	145
4.2.3.1.	Fusiones celulares.	145
4.2.3.2.	Clonaje de los híbridos seleccionados.	148
4.2.4.	PRODUCCIÓN DE LÍQUIDO ASCÍTICO CON ANTICUERPOS MONOCLONALES.	149
4.3.	<u>CARACTERIZACIÓN DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES OBTENIDOS FRENTE A <i>Nosema</i> spp.</u>	150
4.3.1.	ISOTIPADO DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES.	150
4.3.2.	TITULACIÓN DE LOS SOBRENADANTES SATURADOS Y ACITIS DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES.	151
4.3.2.1.	Titulación de los sobrenadantes saturados.	151
4.3.2.2.	Titulación de los líquidos ascíticos.	152
4.3.3.	ESTUDIO DE REACCIONES CRUZADAS DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES.	152
4.3.3.1.	Reacciones cruzadas de los sobrenadantes saturados de los anticuerpos monoclonales.	152
4.3.3.2.	Reacciones cruzadas de los líquidos ascíticos de los anticuerpos monoclonales.	155
4.3.4.	OBTENCIÓN DE ANTÍGENO SOLUBLE DE ESPORA. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO PROTEICO.	157
4.3.5.	CARACTERIZACIÓN ANTIGÉNICA DE <i>N. ceranae</i> Y <i>N. apis</i> MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (12 – 15 %, SDS-PAGE).	157
4.3.5.1.	Perfil proteico de <i>N. ceranae</i> .	157
4.3.5.2.	Perfil proteico de <i>N. apis</i> .	161
4.3.5.3.	Estudio comparativo de los perfiles proteicos de <i>N. ceranae</i> y <i>N. apis</i> .	161
4.3.6.	DETERMINACIÓN DE PERFILES DE INMUNORRECONOCIMIENTO DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A <i>N. ceranae</i> Y <i>N. apis</i> MADIANTE INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (Western Blot)	164
4.3.6.1.	Perfiles de inmunorreconocimiento del anticuerpo monoclonal F1. 6F10.	164

4.3.6.2.	Perfiles de inmunorreconocimiento del anticuerpo monoclonal F1. 7D2.	164
4.3.6.3.	Perfiles de inmunorreconocimiento del anticuerpo monoclonal F4. 1B11.	166
4.3.6.4.	Perfiles de inmunorreconocimiento del anticuerpo monoclonal F4. 9G2.	166
4.4.	<u>EVALUACIÓN DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES EN EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE <i>N. ceranae</i> Y <i>N. apis</i>.</u>	168
4.4.1.	DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE <i>N. ceranae</i> Y <i>N. apis</i> MEDIANTE IFI.	168
4.4.1.1.	Estudio con el anticuerpo monoclonal F1. 6F10 frente a <i>Nosema</i> spp.	168
4.4.1.2.	Estudio con los anticuerpos monoclonales frente a <i>N. ceranae</i> .	173
	a) Estudio con el anticuerpo monoclonal F1. 7D2.	173
	b) Estudio con el anticuerpo monoclonal F4. 1B11.	174
4.4.1.3.	Estudio con el anticuerpo monoclonal F4. 9G2 frente a <i>N. apis</i> .	174
4.4.2.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.	175
4.4.2.1.	Anticuerpo monoclonal F1. 6F10 frente a <i>Nosema</i> spp.	175
4.4.2.2.	Anticuerpos monoclonales frente a <i>N. ceranae</i> .	177
	a) Anticuerpo monoclonal F1. 7D2.	177
	b) Anticuerpo monoclonal F4. 1B11.	177
4.4.2.3.	Anticuerpo monoclonal F4. 9G2 frente a <i>N. apis</i> .	178
4.4.2.4.	Especificidad y sensibilidad de las distintas técnicas diagnósticas.	179
	a) Especificidad y sensibilidad de la técnica de IFI con el anticuerpo monoclonal F1. 6F10 frente a <i>Nosema</i> spp.	180
	b) Especificidad y sensibilidad de la técnica de IFI con los anticuerpos monoclonales frente a <i>N. ceranae</i> .	180
	b.1) Especificidad y sensibilidad de la técnica de IFI con el anticuerpo monoclonal F1. 7D2.	180
	b.2) Especificidad y sensibilidad de la técnica de IFI con el anticuerpo monoclonal F4. 1B11.	181
	c) Especificidad y sensibilidad de la técnica de IFI con el anticuerpo monoclonal F4. 9G2 frente a <i>N. apis</i> .	181
5.	<b>DISCUSIÓN.</b>	183
5.1.	<u>OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES FRENTE A <i>N. ceranae</i> Y <i>N. apis</i>.</u>	186
5.2.	<u>OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A <i>N. ceranae</i>.</u>	190

5.3.	<u>CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES OBTENIDOS FRENTE A <i>Nosema spp.</i></u>	195
5.4.	<u>EVALUACIÓN DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES EN EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE <i>N. ceranae</i> Y <i>N. apis</i>.</u>	199
6.	<b>CONCLUSIONES.</b>	205
7.	<b>BIBLIOGRAFÍA.</b>	207
<b>B. ÍNDICE DE TABLAS.</b>		
		Pág.
1.	<b>INTRODUCCIÓN.</b>	
	<b>Tabla 1.1.</b> Anticuerpos monoclonales múridos obtenidos para la detección de microsporidiosis. Obtenido y ampliado de Izquierdo, 2007.	67
	<b>Tabla 1.2.</b> Líneas tumorales más utilizadas en la producción de anticuerpos monoclonales.	86
3.	<b>MATERIAL Y MÉTODOS.</b>	
3.1.	<u>OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES FRENTE A <i>N. ceranae</i> Y <i>N. apis</i>.</u>	
	<b>Tabla 3.1.1.</b> Protocolo de inmunización de los conejos inoculados con esporas de <i>N. ceranae</i> (Lote nº 1).	108
	<b>Tabla 3.1.2.</b> Protocolo de inmunización de los conejos inoculados con esporas de <i>N. apis</i> (Lote nº 2).	108
3.2.	<u>OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A <i>N. ceranae</i>.</u>	
	<b>Tabla 3.2.1.</b> Inóculos de esporas de <i>N. ceranae</i> administrados al lote de ratones.	114
3.3.	<u>CARACTERIZACIÓN DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES OBTENIDOS FRENTE A <i>Nosema spp.</i></u>	
	<b>Tabla 3.3.1.</b> Protocolos de obtención de antígeno soluble.	124
	<b>Tabla 3.3.2.</b> Tratamientos químicos para las muestras de electroforesis.	125
4.	<b>RESULTADOS.</b>	
4.1.	<u>OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES FRENTE A <i>N. ceranae</i> Y <i>N. apis</i>.</u>	
	<b>Tabla 4.1.1.</b> Lotes de esporas recibidas y recuentos antes y después de la purificación.	131
	<b>Tabla 4.1.2.</b> Resultados de la titulación de los sueros obtenidos del Conejo 1 inmunizado con <i>N. ceranae</i> .	132
	<b>Tabla 4.1.3.</b> Resultados de la titulación de los sueros obtenidos del Conejo 2 inmunizado con <i>N. ceranae</i> .	132

<b>Tabla 4.1.4.</b>	Resultados de la titulación de los sueros obtenidos del Conejo 3 inmunizado con <i>N. apis</i> .	133
<b>Tabla 4.1.5.</b>	Resultados de la titulación de los sueros obtenidos del Conejo 4 inmunizado con <i>N. apis</i> .	133
<b>Tabla 4.1.6.</b>	Detección de <i>N. ceranae</i> en 180 colmenas mediante PCR, inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando el anticuerpo policlonal (Pc) de conejo frente a <i>N. ceranae</i> y microscopía óptica (MO).	135
<b>Tabla 4.1.7.</b>	Resultados de la detección de <i>N. ceranae</i> en 180 colmenas mediante PCR, mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando el anticuerpo policlonal (Pc) y mediante microscopía óptica (MO).	139
<b>Tabla 4.1.8.</b>	Resumen de los falsos positivos y negativos obtenidos por la inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando el anticuerpo policlonal así como por microscopía óptica (MO).	139
<b>Tabla 4.1.9.</b>	Tabla de contingencia: PCR frente a IFI con anticuerpo policlonal (Pc).	140
<b>Tabla 4.1.10.</b>	Escala de valoración del Índice de Kappa (Altman, 1991).	141
<b>Tabla 4.1.11.</b>	Tabla de contingencia: PCR frente a MO.	141
<b>Tabla 4.1.12.</b>	Porcentajes de sensibilidad y especificidad (Intervalo de Confianza) del Test Diagnóstico comparando la PCR frente a la MO y la IFI con el anticuerpo policlonal frente a <i>N. ceranae</i> (Nivel de confianza del 95%).	142
<b>4.2.</b>	<u>OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A <i>N. ceranae</i>.</u>	
<b>Tabla 4.2.1.</b>	Resultados de la titulación de los sueros obtenidos del lote de ratones inmunizados con <i>N. ceranae</i> .	143
<b>Tabla 4.2.2.</b>	Resultados de la titulación de los sueros obtenidos tras la administración de la dosis de recuerdo o sin ella.	144
<b>Tabla 4.2.3.</b>	Resultados obtenidos en las Fusiones Celulares.	147
<b>Tabla 4.2.4.</b>	Resultados obtenidos en el 1 <sup>er</sup> clonaje.	148
<b>Tabla 4.2.5.</b>	Resultados obtenidos en el 2 <sup>o</sup> clonaje.	148
<b>Tabla 4.2.6.</b>	Resultados obtenidos en el 3 <sup>er</sup> clonaje.	149
<b>Tabla 4.2.7.</b>	Resultados obtenidos en el 4 <sup>o</sup> clonaje.	149
<b>Tabla 4.2.8.</b>	Condiciones de la producción de ascitis y volúmenes obtenidos.	150



**4.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES OBTENIDOS FRENTE A *Nosema* spp.**

<b>Tabla 4.3.1.</b>	Reactividad de los anticuerpos monoclonales frente a <i>N. apis</i> y <i>N. ceranae</i> .	151
<b>Tabla 4.3.2.</b>	Títulos obtenidos mediante IFI de los sobrenadantes saturados frente a <i>N. ceranae</i> y <i>N. apis</i> .	151
<b>Tabla 4.3.3.</b>	Títulos obtenidos mediante IFI de los líquidos ascíticos frente a <i>N. ceranae</i> y <i>N. apis</i> .	152
<b>Tabla 4.3.4.</b>	Reacciones cruzadas obtenidas mediante IFI del sobrenadante saturado del anticuerpo monoclonal F1. 6F10.	153
<b>Tabla 4.3.5.</b>	Reacciones cruzadas obtenidas mediante IFI del sobrenadante saturado del anticuerpo monoclonal F1. 7D2.	153
<b>Tabla 4.3.6.</b>	Reacciones cruzadas obtenidas mediante IFI del sobrenadante saturado del anticuerpo monoclonal F4. 1B11.	154
<b>Tabla 4.3.7.</b>	Reacciones cruzadas obtenidas mediante IFI del sobrenadante saturado del anticuerpo monoclonal F4. 9G2.	154
<b>Tabla 4.3.8.</b>	Reacciones cruzadas obtenidas mediante IFI del líquido ascítico del AcMc F1.6F10.	155
<b>Tabla 4.3.9.</b>	Reacciones cruzadas obtenidas mediante IFI del líquido ascítico del AcMc F1.7D2.	156
<b>Tabla 4.3.10.</b>	Reacciones cruzadas obtenidas en IFI del líquido ascítico del AcMc F1.9G2.	156
<b>Tabla 4.3.11.</b>	Distintos protocolos de obtención de antígeno soluble y resultados de los mismos.	157
<b>Tabla 4.3.12.</b>	Pesos moleculares de las bandas presentes en el perfil proteico de espora completa de <i>N. ceranae</i> (SDS-PAGE al 12 %, tratamiento NuPAGE®).	160
<b>Tabla 4.3.13.</b>	Pesos moleculares de las bandas presentes en el perfil proteico de espora espora completa de <i>N. apis</i> (SDS-PAGE al 12 %, tratamiento NuPAGE®).	161
<b>Tabla 4.3.14.</b>	Perfiles proteicos (kDa) de espora completa de <i>N. ceranae</i> y <i>N. apis</i> (SDS-PAGE al 12 %, tratamiento NuPAGE®).	163

**4.4. EVALUACIÓN DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES EN EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE *N. ceranae* Y *N. apis*.**

<b>Tabla 4.4.1.</b>	Porcentaje de resultados positivos y negativos en la detección de <i>N. ceranae</i> y/o <i>N. apis</i> en 180 colmenas mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando el anticuerpo monoclonal F1. 6F10; mediante PCR y mediante microscopía óptica (MO).	168
---------------------	--	-----

<b>Tabla 4.4.2.</b>	Detección de <i>N. apis</i> y/o <i>N. ceranae</i> en 180 colmenas mediante PCR, inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando el anticuerpo policlonal de conejo (Pc) y los sobrenadantes saturados de los híbridos F1. 6F10; F1. 7D2; F4. 1B11 y F4. 9G2 y microscopía óptica (MO).	169
<b>Tabla 4.4.3.</b>	Porcentaje de resultados positivos y negativos en la detección de <i>N. ceranae</i> en 180 colmenas mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando el anticuerpo policlonal (Pc) y los anticuerpos monoclonales F1. 7D2 y F4. 1B11; mediante PCR y mediante microscopía óptica (MO).	173
<b>Tabla 4.4.4.</b>	Porcentaje de resultados positivos y negativos en la detección de <i>N. apis</i> en 180 colmenas mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando el anticuerpo monoclonal F4. 9G2; mediante PCR y mediante microscopía óptica (MO).	174
<b>Tabla 4.4.5.</b>	Resumen de los falsos positivos y negativos obtenidos por la inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando los distintos anticuerpos policlonal y monoclonales así como por la microscopía óptica (MO).	175
<b>Tabla 4.4.6.</b>	Tabla de contingencia: PCR frente a IFI con F1. 6F10.	176
<b>Tabla 4.4.7.</b>	Tabla de contingencia: PCR frente a MO.	176
<b>Tabla 4.4.8.</b>	Tabla de contingencia: PCR frente a IFI con F1. 7D2.	177
<b>Tabla 4.4.9.</b>	Tabla de contingencia: PCR frente a IFI con F4. 1B11.	178
<b>Tabla 4.4.10.</b>	Tabla de contingencia: PCR frente a IFI con F4. 9G2.	179
<b>Tabla 4.4.11.</b>	Tabla de contingencia: PCR frente a MO.	179
<b>Tabla 4.4.12.</b>	Porcentajes de sensibilidad y especificidad (Intervalo de Confianza) del Test Diagnóstico comparando la PCR frente a la MO y la IFI con F1. 6F10, frente a <i>N. apis</i> y <i>N. ceranae</i> (Nivel de confianza del 95%).	180
<b>Tabla 4.4.13.</b>	Porcentajes de sensibilidad y especificidad (Intervalo de Confianza) del Test Diagnóstico comparando la PCR frente a la MO y la IFI con el anticuerpo policlonal (Pc) y los anticuerpos monoclonales F1. 7D2 y F4. 1B11, frente a <i>N. ceranae</i> (Nivel de confianza del 95%).	181
<b>Tabla 4.4.14.</b>	Porcentajes de sensibilidad y especificidad (Intervalo de Confianza) del Test Diagnóstico comparando la PCR frente a la MO y la IFI con el anticuerpo monoclonal F4.9G2 frente a <i>N. apis</i> (Nivel de confianza del 95%).	181

### C. LISTA DE ABREVIATURAS.

ACF	Adyuvante completo de Freund.
AcMc	Anticuerpo monoclonal.
AcPc	Anticuerpo policlonal.
ABPV	<i>Acute Bee Paralysis Virus.</i> Virus de la parálisis aguda de las abejas.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ADEPT	<i>Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy.</i> Terapia de enzimas dirigida por anticuerpos.
ADP	Adenosín difosfato.
ARN	Ácido ribonucleico.
ARNm	ARN mensajero.
ARNr	ARN ribosómico.
ATP	Adenosín trifosfato.
BQCV	<i>Black Queen Cell Virus.</i> Virus de las celdas reales negras
BSA	Albúmina sérica bovina.
CAR	Centro Apícola Regional (Guadalajara, España).
CBPV	<i>Chronic Bee Paralysis Virus.</i> Virus de la parálisis crónica de las abejas.
CCD	<i>Colony Collapse Disorder.</i> Desorden del colapso de las colmenas.
CCL	<i>Drinking Water Contaminant Candidate List.</i> Lista de candidatos a contaminantes microbianos del agua (EPA).
CDR	<i>Complementarity determining regions.</i> Regiones hipervariables de las inmunoglobulinas.
CDS	<i>Colony depopulation syndrome.</i> Síndrome de despoblamiento de las colmenas.
DAB	Diamino bencidina.
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol.
DEAE	Dietilaminoetanol.
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's médium.</i> Medio Eagle modificado por Dulbecco.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid.</i>

	Ácido desoxirribonucleico.
DO	Densidad óptica.
dsRNA	<i>Double stranded RNA</i> . ARN de doble cadena.
DWV	<i>Deformed Wing Virus</i> Virus de las alas deformes.
EF	Factor de elongación traslación.
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> . Enzimainmunoensayo.
EMEM	<i>Eagle's minimal essential medium</i> . Medio mínimo esencial de Eagle.
EO	Etil oleato.
EPA	<i>Environmental protection Agency</i> . Agencia de Protección Ambiental (Estados Unidos).
Fab	<i>Fragment antigen-binding</i> . Región de unión al antígeno de las inmunoglobulinas.
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorter</i> . Clasificación de células activadas por fluorescencia.
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> . Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura.
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> . Administración de alimentos y medicamentos (Estados Unidos).
FISH	<i>Fluorescent in situ hybridization</i> . Hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia.
GAG	Glicosaminoglicanos.
GAT	<i>Genomic Antibody Technology</i> . Tecnología de anticuerpos genómicos.
GLD	Glucosa deshidrogenasa.
HAMA	<i>Human anti murine antibodies</i> . Anticuerpos humanos anti murinos.
HAT	Hipoxantina, aminopterina, timidina.
HGPRT	Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa.
HGPRT <sup>-</sup>	Deficiencia en HGPRT.
IAPV	<i>Israeli Acute Paralysis Virus</i> . Virus israelita de la parálisis aguda.
IF	Inmunofluorescencia.
IFA	<i>Immunofluorescence assay</i> .

	Inmunofluorescencia.
IFI	Inmunofluorescencia indirecta.
IFN	Interferón.
Ig	Inmunoglobulina.
IgG	Inmunoglobulina isotipo G.
IgM	Inmunoglobulina isotipo M.
IPM	<i>Intengrated Pest Management</i> . Control de plagas integrado.
ITS	<i>Internal transcribed spacer</i> . Espaciador intergénico transcrito.
JH	Hormona juvenil
KBV	<i>Kashmir Bee Virus</i> . Virus Kashmir de las abejas.
L <sub>B</sub>	Linfocito B.
LSU-ARNr	Subunidad grande del ARN ribosomal.
LYS	Lisozima.
MAbs	<i>Monoclonal antibodies</i> . Anticuerpos monoclonales.
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-Of-Flight</i> . Desorción/ionización láser asistida por matriz con detector TOF.
MET	Microscopía electrónica de transmisión.
MO	Microscopía óptica.
MS	<i>Mass spectrometry</i> . Espectrometría de masas.
nanoLC	<i>nano Liquid chromatography</i> . Nanocromatografía líquida con espectrometría de masas.
NIAID	<i>National Institute of Allergy and Infectious Diseases</i> . Instituto nacional de alergias y enfermedades infecciosas (Estados Unidos).
NIH	<i>National Institute of Health</i> . Instituto Nacional de Salud (Estados Unidos).
OM	<i>Optical microscope</i> . Microscopio óptico.
OPD	Orto-fenilenodiamina.
PAS	<i>Periodic acid-Schiff</i> .
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> . Tampón fosfato salino.

PCR	<i>Polymerase chain reaction.</i> Reacción en cadena de la polimerasa.
PCR-RFLP	<i>PCR-Restriction fragment length polymorphism.</i> PCR con fragmentos de restricción.
PEG	Polietilen-glicol.
Pm	Peso molecular.
PO	(profenol-) Fenoloxidasas.
PTP	Proteína del tubo polar.
PVA	Alcohol polivinílico.
PVDF	Polivinilideno difluoro.
PVP	Polivinilpirrolidona.
Q-PCR	<i>Quantitative-PCR.</i> PCR-cuantitativa.
RER	Retículo endoplasmático rugoso.
RNA	<i>Ribonucleic acid.</i> Ácido ribonucleico.
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium.</i> Medio Roswell Park Memorial Institute.
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa reversa (retrotranscriptasa).
SBF	Suero bovino fetal.
SBV	<i>Sacbrood virus.</i> Virus de la cría.
scFv	<i>Single-chain Fv.</i> Fragmento Fv monocaténario o anticuerpo monocaténario.
SDS	Dodecilsulfato sódico.
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.</i> Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida.
SRV	<i>Respiratory syncytial virus.</i> Virus respiratorio sincitial.
SSU-ARNr	Subunidad pequeña del ARN ribosomal (16s-ARNr).
SVA-USP-CEU	Servicio de animalario y Cirugía Experimental de la facultad de Farmacia de la Universidad San Pablo-CEU.
SWP	<i>Spore wall protein.</i> Proteína de la pared de la espora.
TEM	<i>Transmission electron microscopy.</i>

	Microscopía electrónica de transmisión.
TK	Timidina quinasa.
TK <sup>-</sup>	Deficiencia en TK.
UV	Ultravioleta.
VDV-1	<i>Varroa destructor virus-1</i> . Virus Varroa Destructor-1
Vg	Vitelogenina.
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana.

## I. RESUMEN.

La nosemosis es una enfermedad común que afecta a las abejas en todo el mundo y que está causada por microsporidios pertenecientes al género *Nosema*. Originalmente, la única especie conocida por causar esta enfermedad en las abejas europeas (*Apis mellifera*) era *Nosema apis*, hasta que en 2005 se identificó a *Nosema ceranae* en este hospedador. Ambas especies infectan y se multiplican en las células ventriculares del intestino de las abejas adultas de *A. mellifera*, aunque *N. ceranae* parece ser más patógena que *N. apis* en condiciones experimentales, y se le ha relacionado con los colapsos de colmenas en distintos estudios.

En la actualidad, la identificación de *N. ceranae* y *N. apis* se ha basado en técnicas de microscopía y moleculares. Debido a sus características morfológicas como tamaño, forma y refringencia, las esporas de *Nosema* sp. se pueden visualizar fácilmente con microscopio óptico (MO). Sin embargo, el diagnóstico diferencial entre especies resulta complicado dado que las mayores diferencias entre estas son ultraestructurales y requieren la utilización de la microscopía electrónica de transmisión (MET). Para el diagnóstico e identificación de estas especies actualmente se utilizan técnicas moleculares como la PCR simple, PCR múltiple, y PCR con fragmentos de restricción (PCR-RFLP), en tiempo real y cuantitativa (Q-PCR). Sin embargo, tanto la MET como las técnicas moleculares son caras y poco accesibles para muchos laboratorios, por lo que el objetivo principal de este trabajo es la obtención y caracterización de anticuerpos monoclonales (AcMc) frente a *N. ceranae* y *N. apis*, que posibiliten el desarrollo de una técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) rápida, específica y sensible que permita identificar ambas especies en muestras de colmenas.

Para la consecución del objetivo marcado, primero se procedió a la obtención de sueros policlonales frente a *N. ceranae* y *N. apis*. Con este fin, se inocularon esporas purificadas de cada especie en un lote distinto de conejos Nueva Zelanda. Los sueros obtenidos en cada una de las sangrías realizadas a lo largo del protocolo de inmunización se titularon frente a la especie homóloga mediante IFI. Así mismo, se estudiaron las posibles reacciones cruzadas de dichos sueros frente a otras especies heterólogas de microsporidios mediante la misma técnica. Los protocolos de inmunización del lote de conejos inoculados con *N. apis* se suspendieron dado que los sueros obtenidos mostraron títulos bajos frente a su especie homóloga y presentaron reacción cruzada frente a *N. ceranae*. Sin embargo, los sueros del lote frente a *N. ceranae* no mostraron reacciones cruzadas con ninguna de las especies heterólogas, por lo que uno de ellos se seleccionó para llevar a cabo la técnica de IFI que identificara esta especie.

La técnica de IFI desarrollada se validó realizando un estudio comparativo de sus resultados con aquellos obtenidos en el Centro Apícola Regional (CAR) mediante MO y PCR múltiple, para el diagnóstico de 180 muestras de colmenas sin infectar e infectadas por *N. ceranae* y/o *N. apis*. El análisis de Test Diagnóstico mostró que la IFI empleando el suero policlonal presentó una sensibilidad y una especificidad mayores que la MO y similares a las de



la PCR múltiple (técnica de referencia), por lo que esta IFI podría utilizarse como técnica alternativa o complementaria para estas técnicas.

Tras los resultados obtenidos con el suero policlonal, se procedió a la obtención de AcMc frente a *N. ceranae*, para lo que se inoculó un lote de ratones BALB/c con esporas purificadas de esta especie. Los esplenocitos de estos ratones se sometieron a un proceso de fusión celular con células de mieloma, obteniendo hibridomas potencialmente inmortales y secretores de anticuerpos (Ac), que se cribaron mediante un medio selectivo. Aquellos hibridomas que secretaban el Ac deseado se seleccionaron mediante IFI y entre ellos se escogieron cuatro: F1. 6F10 frente a *Nosema* sp., F1. 7D2 y F4. 1B11 específicos de *N. ceranae* y F4. 9G2 específico de *N. apis*. Éstos se expandieron y se clonaron por dilución límite para asegurar tanto su monoclonalidad como su estabilidad en el crecimiento y en la producción de anticuerpos monoespecíficos. Una vez estabilizado, cada hibridoma se inoculó en un lote de ratones BALB/c para la producción *in vivo* de elevadas concentraciones de los AcMc en líquido ascítico. Como excepción, el AcMc F4. 1B11 no produjo ascitis.

Tras la obtención de los AcMc se procedió a su caracterización. En primer lugar se determinó el isotipo que fue de la clase IgM en todos los casos. Posteriormente se realizaron estudios mediante IFI para conocer la reactividad de los AcMc frente a su especie homóloga y frente a otras especies heterólogas de microsporidio. Finalmente se determinó el perfil proteico de las esporas de *N. ceranae* y *N. apis* mediante electroforesis revelada con tinción de plata, así como el patrón de inmunorreconocimiento frente a ambas especies de cada uno de los AcMc seleccionados, mediante la técnica de inmuno-electrotransferencia o *Western Blot*.

Para el desarrollo y validación de la IFI empleando los AcMc, se seleccionaron diluciones de los mismos que permitieran la detección de las esporas sin presentar reacciones cruzadas con especies heterólogas. Así mismo, se llevó a cabo un análisis comparativo de los resultados obtenidos empleando los AcMc con aquellos obtenidos anteriormente empleando el suero policlonal y las técnicas de MO y PCR múltiple en el diagnóstico de 180 muestras de colmenas sin infectar e infectadas con *N. ceranae* y/o *N. apis*. El AcMc F1. 6F10 (frente a *Nosema* sp.) presentó una sensibilidad y especificidad similares a las de la MO y muy cercanas a las de la PCR de referencia. Los AcMc F1. 7D2 y F4. 1B11, frente a *N. ceranae* presentaron una sensibilidad cercana a la de la PCR y superior a la de la MO. El análisis estadístico mostró similitud en las especificidades de la IFI y la MO pero un estudio pormenorizado de los resultados demostró un mayor número de falsos positivos y/o negativos con respecto a la PCR por parte de la MO. Por último, el AcMc F4. 9G2 reveló una menor sensibilidad que la MO para la detección de *N. apis* mientras que su especificidad fue mayor y más cercana a la de la PCR.

Debido a la sensibilidad y la especificidad mostradas, la técnica de IFI empleando los AcMc obtenidos podría ser una herramienta útil para el diagnóstico de la nosemosis en las colmenas de abejas, pudiendo utilizarla como una alternativa de menor coste, o en combinación con las técnicas ya existentes para una mejor detección e identificación de las distintas especies del parásito.

## II. SUMMARY.

Besides providing a critical ecosystem function, Western honey bees (*Apis mellifera*) are essential pollinators of agriculturally important crops. Pollinators have a strong influence on ecological relationships, ecosystem conservation and stability, genetic variation in the plant community, floral diversity and evolution. In agricultural ecosystems pollinators are vital for agrarian production with more than 35 % of worldwide production and 87 of the main food crops around the world depending on their activity, as well as a significant number of plant-derived medicines. Thus, the maintenance of bee populations is important to enable bees to continue their efficient and useful work.

The honey bee *A. mellifera*, has experienced recent unexplained die-offs around the world. In the United States, Colony Collapse Disorder (CCD), a syndrome characterized by loss of hives and the behavior of hive abandonment, threatens honey bee colonies. There also has been an increase in unexplained colony losses for some regions of Europe and other parts of the world. Honey bee decline has become an increasingly important problem worldwide and has been attributed to multiple underlying causes. A consensus has recently emerged that multiple pathogens such as parasitic mites, fungal parasites and viral infections in concert with increasing environmental stressors are likely to be driving factors behind honey bee decline.

On the other hand, microsporidians are intracellular parasites dispersed between hosts as spores. Their unique infection mechanism, which uses special organs for cell invasion, is based on mechanical injection of a polar filament protruding from the germinating spore. With physical force, the filament penetrates the host cell membrane into the host cell. Through the filament, the infective sporoplasm is injected into the host cell cytoplasm where parasite replication, and later spore production takes place. Based on molecular evidence, Microsporidia are now included into the cluster Fungi. Thus, taxonomically, Microsporidia are highly specialized parasitic Fungi.

To date, two microsporidian species infect honey bees worldwide: *Nosema apis* and *Nosema ceranae*. *N. apis* was shown to infect *A. mellifera* more than one hundred years ago and was one of the first microsporidia to be described. In addition, *N. ceranae* was originally described in *Apis cerana*, though in 2005 its detection was reported in both Europe and Asia and now is known to be present in all five continents. Since these *Nosema* species present different symptoms in honey bees, two different clinical patterns are considered: nosemosis type A caused by *N. apis* and nosemosis type C caused by *N. ceranae*.

Nosemosis caused by *N. apis* also called "dry nosemosis" is characterized, in acute forms, by trembling of honey bee workers, bees with dilated abdomens, brown faecal marks on combs and the front of the hives, sick or dead bees near the hives and a decrease in brood production and in the size of bee colony, particularly in spring. However, the emergent disease caused by *N. ceranae*, presents a different epidemiological pattern and a more virulent pathology which additionally shows no outward symptoms. Thus, nosemosis type C now is considered a major health problem in both individual honey bees and in whole colony.

Since no clinical signs are recognized in the disease caused by *N. ceranae*, diagnosis requires light microscopy or molecular methods. Although the spores of *N. ceranae* are slightly smaller than in *N. apis*, the two species are difficult to tell apart with certainty under an optical microscope (OM). Using transmission electron microscopy (TEM), the species can be separated based on their ultrastructural features. Apart from this, several PCR based molecular techniques for the diagnosis and identification of *N. ceranae* and *N. apis* have been described. Protocols for the PCR-RFLP method, PCR using species specific primers, real-time PCR and multiplex PCR have been published. Nevertheless, PCR and TEM are expensive and time consuming techniques which also require qualified staff and may not be available in every laboratory. Thus, the aim of this work was the production and characterization of monoclonal antibodies (MAbs) against *N. ceranae* and *N. apis*, to develop an attainable Immunofluorescence assay (IFA) which allows the differential diagnosis of these two *Nosema* species.

Firstly, hyperimmune sera were obtained from New Zealand rabbits immunized with inoculations of purified spores of *N. ceranae* or *N. apis*. Sera from each bleeding were collected and pooled from rabbits within each group. All of them were assayed against both homologous and heterologous *Nosema* species by IFA. Titers from the sera against *N. ceranae* reached 6400 and showed a slight cross-reaction against *N. apis*, which disappeared using dilutions. On the other hand, sera against *N. apis* showed a stronger reaction against *N. ceranae* than against their homologous species, therefore, *N. apis* immunization protocol was suspended.

Consequently, for the IFA test development only polyclonal sera against *N. ceranae* were used. A serum from the last bleeding was chosen due to its high titer and was diluted 1:1600 so as not to cross-react against *N. apis*. Moreover, it was assayed against other different heterologous microsporidian such as *Encephalitozoon intestinalis*, *Encephalitozoon cuniculi*, *Encephalitozoon hellem*, *Enterocytozoon bieneusi*, *Vittaforma corneae* and *A. algerae*, showing no cross-reaction with any of them.

In order to validate the polyclonal antibody-based IFA for detection of *N. ceranae*, it was tested against 180 hive samples either free of infection or infected with *N. ceranae* and/or *N. apis*. Smears were prepared on microscope slides from purified spores pools. They were air dried, fixed in methanol-acetone (1:1) and then incubated with the murine polyclonal antiserum. Fluorescein isocyanate conjugated anti rabbit was used for the immunodetection under UV light microscopy.

The results were statistically compared with those provided by the *Centro Apícola Regional* (CAR) using OM and multiplex PCR, being the latest the golden standard in the analysis. Even though percentages of positive and negative samples were similar among the three techniques, IFA showed more concordance with the PCR than the OM. OM did not permit a clear differentiation between *N. ceranae* and *N. apis* in coinfecting samples, even being carried out by experts. What is more, IFA not only allowed a better separation between species but also did detect spores in samples where PCR did not. Since the PCR detects DNA it can't detect extruded spores, but given that the IFA reacted against the spore wall it could detect even the

empty ones. The Diagnostic Test revealed higher sensitivity (94.62 %) and specificity (90.80 %) for IFA than for OM (88.17% and 90.8% respectively) when compared with those for the PCR.

On balance, the IFA Test using polyclonal antibodies could be an alternative for OM, a technique that provides less sensitivity and specificity and in addition requires professional specialization. Furthermore, this IFA test could be used along with the PCR for a better detection and differentiation between *N. ceranae* and *N. apis* or even as an alternative in laboratories where the molecular technique is not available, given that they have similar sensitivity and specificity.

After the results obtained with the polyclonal antibodies, the MAbs production was carried out immunizing a group of ten BALB/c mice with inoculations of *N. ceranae* purified spores. During the immunization period the pooled hyper immune sera were assayed against their homologous specie, *N. ceranae* and heterologous *N. apis* by IFA. Titers against *N. ceranae* increased with every inoculation reaching a maximum of 3200 in the last bleeding. A strong reaction against *N. apis* (3200 titer) appeared in the third bleeding, probably due to a mixture of both species spores in the previous inoculation. However, this reaction disappeared in the fourth bleeding.

Four days after the last inoculation, mice spleen cells were fused with the murine myeloma cell line P3X63-Ag8.653 obtaining hybridomas that could both divide indefinitely and secrete antibodies. The cells were then distributed to 96 well plates containing feeder cells to supply growth factors and in addition, a special selection medium in which only hybridomas could grow. A total of six cell fusions were carried out, with growing percentages raging between 65 % and 100 %. The supernatants were screened for antibody production by IFA and the percentage of hybridomas secreting antibodies against *N. ceranae* varied in each fusion from 5.1 % to 23.2 %. Four hybridomas were chosen among all the secretors: F1. 6F10 against *Nosema* sp., F1. 7D2 and F4. 1B11 against *N. ceranae* and finally F4. 9G2 against *N. apis*. The selected hybridomas were then expanded and cloned by "limiting dilution" at least three times so as to assure they were monoclonal and moreover stable in the production of monospecific antibodies.

In order to get high MAb concentrations, ascites fluid for the different MAbs was produced in BALB/c mice by intraperitoneal injection of pristane followed by intraperitoneal injection of each stabilized hybridoma cells. Only the F4. 1B11 hybrid was not able to produce ascites.

Once the MAbs were produced they were tested for their characterization. Firstly, their isotype was determined and it happened to be IgM ( $\kappa$  light chain) for all of them. Secondly, both the supernatants and the ascites were assayed against their homologous specie by IFA. As regards to the supernatants, MAb F1. 6F10 (against *Nosema* genus) showed similar reactions against *N. ceranae* and *N. apis* with 200 and 100 titers respectively. Additionally, MAbs F1. 7D2 and F4. 1B11 (against *N. ceranae*) reached 200 and 50 titers respectively when assayed against this specie, and F4. 9G2 showed 5 titer against its homologous specie *N. apis*. On the other hand,

given their higher concentration of MAbs, ascites fluids titers increased regarding those of the supernatants. For example F1. 6F10 ascites fluid showed a 6400 titer against *N. apis* and 3200 titer against *N. ceranae*. Moreover, F1. 7D2 ascites reached 3200 titer against *N. ceranae* while F4. 9G2 showed 1600 titer against *N. apis*, their homologous species. There is a need to recall that MAb F4. 1B11 did not produce ascites when inoculated to mice.

Alternately, the MAbs were also tested against various heterologous antigens such as *E. intestinalis*, *E. cuniculi*, *E. hellem*, *E. bieneusi*, *V. corneae* or *A. algerae*, and what is more important, the heterologous specie infecting bee hives *N. ceranae* or *N. apis* depending on the MAb specificity. It is remarkable that, besides their high specificity against their homologous antigen, none of the MAbs supernatants against *N. ceranae* (F1. 7D2 and F4. 1B11) cross-reacted with *N. apis*. Nevertheless, F4. 9G2 supernatant which homologous antigen is *N. apis*, showed a slight cross-reaction against *N. ceranae*, something understandable since this species are closely related and could be sharing common epitopes. Anyway this reaction disappeared when diluting the supernatant. Appart from this, all of the MAbs cross-reacted weakly with *V. corneae* and *A. algerae*. Due to the fact that both species were originally classified in the *Nosema* genus as *Nosema corneum* and *Nosema algerae* respectively, this cross-reaction might have the same explanation: common epitopes for the genus *Nosema*. Although this would not explain why F1. 7D2, F4. 1B11 and F4. 9G2 reacted against *E. hellem*, since it is not phylogenetically close to *Nosema*, the fact that low dilutions boost inespecificity would. Indeed, the cross-reaction disappeared when diluting the supernatants.

Regarding the ascites fluids, F1. 7D2 and F4. 9G2 cross-reacted with their heterologous *Nosema* specie (*N. apis* and *N. ceranae* respectively), though the titers (100 and 50) were by far lower than those against their homologous (3200 and 1600) which permits the differential diagnostic between both species. Moreover, ascites fluids showed cross-reactions against the same species than the supernatants (*V. corneae*, *A. algerae* and *E. hellem*), but with higher titers. Besides this, F1. 6F10, F1. 7D2 and F4. 9G2 MAbs showed cross-reaction against *E. intestinalis* and in addition, F1. 6F10 cross-reacted with *E. cuniculi*. Either the higher concentration of the MAbs in the ascites or the heterogeneity in the ascites fluid composition might explain this unspecific response. Taking in account that these reactions disappeared with dilutions and that none of these species have been described infecting bee hives, choosing the right dilution would allow to use the ascites fluid for the *N. ceranae* and *N. apis* differential diagnostic.

Lastly, the MAbs characterization was completed by SDS-PAGE and Western blotting (immunoblotting) against the *N. ceranae* and *N. apis*, the two species causing nosemosis in beehives. Proteins from the spore were separated by SDS-PAGE under reducing conditions and transferred to PVDF membranes. The membrane antigen strips were incubated with MAbs supernatants without diluting them. This was followed by immunodetection using anti-mouse IgM conjugate and color development with DAB. Every MAb was assayed against both their homologous and heterologous *Nosema* species and all of them reacted against both species showing different recognition patterns but sharing bands with the same molecular weights. This

might be due to either the use of non diluted supernatants which increases non specific signal or maybe common antigens recognition.

In addition, some of the bands happened to have the same molecular weight than those recognized by other polyclonal and monoclonal antibodies against *Nosema bombycis*, produced and characterized by different authors. This similarity between the bands molecular weights recognized by the different antibodies might be owing to the fact that the three *Nosema* species (*N. ceranae*, *N. apis* and *N. bombycis*) are sharing a common antigen. Furthermore, some of these bands had the same molecular weight than those described for some spore wall proteins characterized in *N. bombycis*. Thus, F1. 6F10, F1. 7D2 and F4. 1B11 MAbs recognition of the 26 kDa band in *N. ceranae* may be related to the presence of SWP26 protein (25,7 kDa) as well as the 33 kDa band recognized by all of them in *N. apis* would relate to the SWP32 (32,7 kDa). However, this fact should be confirmed by further proteomic analysis.

Finally, an IFA test using the produced and characterized MAbs was developed for the differential diagnostic of *N. ceranae* and *N. apis* in bee hive samples. The IFA test was performed as described previously. MAbs dilutions were chosen to assure a good signal as well as to avoid cross-reactions. Again, the results were statistically compared with those provided by the Centro Apícola Regional (CAR) using OM and multiplex PCR, being the latest the golden standard in the analysis.

Regarding to the detection of *Nosema* sp. (*N. ceranae* and/or *N. apis*), MAb F1. 6F10 showed concordance with both OM and PCR results. Since *Nosema* spores are refringent their detection by OM is not difficult and even more when using IFA which provides a fluorescent labeling. The Diagnostic Test revealed similar sensitivity and specificity percentages for both techniques IFA (97.79 % and 93.18 % respectively) and OM (97.79 % and 95.45 %) considering the 100 % for the standard PCR.

When studying the presence of only one of the *Nosema* species differences arose. The results obtained by IFA using F1. 7D2 and F4. 1B11 MAbs (against *N. ceranae*) showed high correlation with those for the PCR and also did the OM but, when observing samples separately, the latter did not make a good differentiation between *N. ceranae* and *N. apis* mixing them up in the identification. This might be a problem since *N. ceranae* is more virulent than *N. apis* requiring fast diagnostic and treatment. Besides this, MAbs F1. 7D2 and F4. 1B11 showed the same sensitivity (93.62 %) but specificity was higher for F4. 1B11 (91.86 %) than that for F1. 7D2 (88.37 %). On the other hand, OM revealed lower sensitivity than the MAbs but the same specificity as F4. 1B11. Since the polyclonal antibody raised in this study was also specific for *N. ceranae* its results were compared with those from F1. 7D2 and F4. 1B11 MAbs revealing higher sensitivity (94.68 %) and specificity (95.35 %) percentages. Nevertheless, the use of polyclonal antibodies is limited to the immunized animal and its characteristics may not be reproducible in a new one. Hybridomas provide MAbs permanently with a stable specificity among the different batches thus permitting assays reproducibility.

Lastly, F4. 9G2 MAb (against *N. apis*) showed more different results comparing to those for the PCR than the OM did. The sensitivity percentage (64.38 %) was lower than the one showed by OM (92.54 %), which might be due to the fact that, trying to avoid cross-reactions, this MAb was used in a very low dilution which may have affected the sensitivity. On the contrary, F4. 9G2 proved to be more specific than OM showing an 87.5 % of specificity against the 80.37 % for the OM in the differential diagnostic of *N. apis*. Problems with sensibility may be solved using the F4. 9G2 MAb in higher concentrations (in the ascites fluid for example). Nevertheless, as nosemosis caused by *N. apis* can be diagnosed by its clinical signs, the use of F4. 9G2 could help to confirm the infection after clinical diagnosis. And, what is more important, using F1. 6F10 against *Nosema* sp. along with F1. 7D2 and F1. 1B11 against *N. ceranae* would help to discard *N. apis* infection.

In conclusion, the results obtained in this work, show the IFA test using the MAbs as a good alternative to the OM, a less sensitive and specific technique that in addition, requires high specialized staff. Moreover, since the IFA test reveals similar sensitivity and specificity than the ones for the PCR, it might be useful, especially in laboratories where the molecular technique is not available, or might be used along with the PCR for a better detection and identification of both *Nosema* species infecting beehives, *N. ceranae* and *N. apis*.

## 1. INTRODUCCIÓN.

### 1.1. ANTECEDENTES.

Las abejas son insectos polinizadores de gran importancia económica debida a la industria apícola, pero además cumplen un papel muy importante en la naturaleza ya que el proceso de polinización que llevan a cabo resulta crítico para la producción de alimentos (las abejas suponen el 90% de la polinización comercial) y por lo tanto, para el mantenimiento del modo de subsistencia humana. Es más, la polinización es un proceso que une directamente los ecosistemas naturales con los sistemas de producción agrícola (Klein y col., 2007; FAO, 2008; Gisder y col., 2010b). La crisis de los polinizadores no sólo tiene impacto sobre la agricultura y su economía, sino que también afecta a la biodiversidad vegetal y al paisaje (Alaux y col., 2010). Dada la importancia tanto ecológica como económica de estos insectos, actualmente existe un gran interés por la reciente disminución de las poblaciones de polinizadores detectada en distintas regiones del mundo (Williams, 2005; FAO, 2008).

Por otro lado, los microsporidios son organismos eucariotas unicelulares que parasitan un amplio rango de hospedadores, desde insectos hasta mamíferos. Actualmente, han adquirido gran importancia para el hombre como patógenos oportunistas emergentes, ya que se han descrito hasta 14 especies que causan enfermedad, principalmente en individuos inmunocomprometidos. El hecho de que algunas de esas especies sean también patógenas para hospedadores animales y de que además se encuentren en el medio en forma de esporas resistentes, sugiere cierto potencial de transmisión zoonótica y ambiental de los mismos (Didier y Weiss, 2006). Aparte de su virulencia para el hombre, es importante resaltar el gran impacto económico que algunos de estos parásitos han tenido sobre aquellas industrias basadas en la cría de animales hospedadores de microsporidios, como por ejemplo la sericultura (gusano de seda), piscicultura (peces) y apicultura (abejas) (Texier y col., 2010).

La nosemosis es una enfermedad común que afecta a las abejas en todo el mundo y que está causada por microsporidios pertenecientes al género *Nosema*. La única especie conocida por producir esta enfermedad en las abejas europeas (*Apis mellifera*) era *Nosema apis*, hasta que en 2005 se identificó a *Nosema ceranae* en este hospedador, tanto en Europa (Higes y col., 2006) como en Taiwán (Huang y col., 2007). Ambas especies infectan y se multiplican en las células ventriculares del intestino de las abejas adultas (obreras, zánganos y reinas) de *A. mellifera*, aunque en condiciones experimentales *N. ceranae* parece ser más patógena que *N. apis*, y se ha relacionado con los colapsos de colmenas en distintas pruebas de campo (Higes y col., 2007; Martin-Hernandez y col., 2007; Paxton y col., 2007; Higes y col., 2008a).

El género *Nosema* engloba más de 150 especies que normalmente parasitan hospedadores invertebrados incluyendo al menos 12 órdenes de insectos (más frecuentemente



*Lepidóptera* e *Hymenoptera*), en los que causan enfermedades bien conocidas como la pebrina, que afecta a los gusanos de seda y que está causada por *Nosema bombycis*, o la disentería en las abejas de la miel, causada a su vez por *N. apis* (Higes y col., 2007).

Hasta la fecha sólo se han descrito dos especies de microsporidios que parasiten a las abejas (*Apis* spp.): *N. apis* y *N. ceranae*. *N. apis* (Zander, 1909) fue uno de los primeros microsporidios en descubrirse hace más de cien años, y se describió en las abejas occidentales o europeas (*A. mellifera*). Más tarde, en el año 1994, *N. ceranae* (Fries y col., 1996) se aisló en abejas orientales o asiáticas (*Apis cerana*) de China.

## 1.2. MICROSPORIDIOS

Los microsporidios son organismos eucariotas unicelulares de muy pequeño tamaño, que en la actualidad se consideran hongos (Adl y col., 2005b). Tienen un ciclo de vida intracelular obligado tanto en hospedadores vertebrados como invertebrados (Canning y Lom, 1986; Canning y Hollister, 1987; Weber y col., 1994). Hasta la fecha se han descrito alrededor de 160 géneros y 1300 especies parasitando animales en todo el mundo, con una mayor prevalencia en peces e insectos (Didier y Weiss, 2006; Li y col., 2009).

### 1.2.1. TAXONOMÍA DE LOS MICROSPORIDIOS.

La primera descripción de un microsporidio se remonta al año 1857 en el que Nageli describe al parásito *N. bombycis*, causante de la pebrina en el gusano de la seda (*Bombix mori*) (Nageli, 1857). Más tarde, en 1882, Balbiani diferencia del resto de Protozoos un grupo de organismos a los que denomina "microsporidios" (Orden *Microsporidia*), que se caracterizan por la formación de esporas de resistencia al final de su ciclo biológico (Balbiani, 1882). En 1977, Sprage los eleva a la categoría de *Phylum Microspora*, dentro del taxón *Protozoa*. A partir de este momento se proponen distintos sistemas de clasificación basados en características ultraestructurales y de reproducción (Sprage y Vabra, 1977). Sin embargo, no se alcanza un consenso acerca de qué características deben ser tenidas en cuenta para establecer relaciones filogenéticas y el hecho de que dichas características sean fenotípicas las hace poco objetivas a la hora de inferir este tipo de relaciones (Weiser, 1985; Issi, 1986; Larsson, 1986; Canning, 1988).

La secuenciación de proteínas o genes con regiones altamente conservadas en el estudio de las relaciones filogenéticas de los microsporidios, ha llevado a dos teorías diferenciadas. Inicialmente, el estudio del gen que codifica el ARN de la subunidad ribosomal pequeña (SSU-ARNr) mostró a los microsporidios como uno de los grupos eucariotas más ancestrales (Vossbrink y col., 1987). Sin embargo, en estudios posteriores, los árboles filogenéticos

construidos basándose en la secuencia de genes que codifican para la proteína Hsp-70 asociada a mitocondrias (Keeling y col., 2005), las  $\alpha$ - y  $\beta$ - tubulinas (Edlind y col., 1996), los factores de elongación traslación EF-1a y EF-2 y la subunidad mayor de la ARN polimerasa II (Vossbrink y col., 1987; Hirt y col., 1999; Adl y col., 2005a; Keeling y col., 2005) presentan a los microsporidios como un grupo de parásitos altamente especializado, que ha evolucionado como adaptación a un modo de vida exclusivamente intracelular.

En la actualidad, basándose en análisis de filogenias de proteínas conservadas y de la secuenciación del genoma completo de *Encephalitozoon cuniculi*, se ha establecido la Clase *Microsporidia*, que se incluye en el cluster *Fungi*, rango *Opisthokonta*, en el que se incluyen los animales, los hongos y otros organismos eucariotas (Adl y col., 2005b). Se consideran por tanto como hongos parásitos altamente especializados (Fries y col., 2006) con un antecesor probablemente zygomyceto (Texier y col., 2010).

#### 1.2.1.1. Filogenia de *N. ceranae* y *N. apis*.

A pesar de que *N. ceranae* y *N. apis* infectan al mismo hospedador y presentan similitudes en las secuencias del gen del ARN ribosómico: 92,7% de identidad para la SSU-ARNr, 91,9% para la subunidad grande ribosomal (LSU-ARNr) y 48,5% para el espaciador intergénico (ITS), demostradas mediante análisis filogenéticos, estas dos especies no están tan próximamente relacionadas entre sí como cabría esperar (Chen y col., 2009b). De hecho *N. ceranae* está más relacionada con *Nosema vespula*, parásito de las avispas, mientras que *N. apis* es una especie más cercana a *Nosema bombi*, parásito de los abejorros (*Bombus* sp.). Sin embargo, otro estudio asoció a *N. ceranae* con *N. bombi* en un mismo grupo en el que *N. apis* sería un miembro basal (Shafer y col., 2009). De todos modos estos resultados deben ser interpretados con prudencia, ya que se ha demostrado que si las unidades repetidas en tándem que forman el ADN ribosómico de estos organismos muestran diferencias, hecho bastante extendido dentro de los microsporidios, las inferencias filogenéticas o epidemiológicas extraídas de su análisis pueden resultar engañosas (Cornman y col., 2009; Higes y col., 2010c; Sagastume y col., 2011).

También se ha utilizado la secuencia de la proteína del tubo polar PTP 1 para analizar la filogenia, en este caso de distintos aislados de *N. ceranae* en Tailandia. Según el análisis de esta proteína los aislados procedentes de abejas de las especies *A. mellifera* y *A. cerana* pertenecerían al mismo linaje filogenético mientras que los aislados de otras especies de abeja presentes en Asia, *Apis dorsata* y *Apis florea*, pertenecerían a otros dos clados distintos (Chaimanee y col., 2011). De nuevo, habría que considerar estas agrupaciones con prudencia ya que en otro estudio se encontraron polimorfismos en las secuencias procedentes de una misma colmena, lo que podría suponer un obstáculo para el genotipado (Hatjina y col., 2011).

### 1.2.2. ORGANIZACIÓN CELULAR DE LOS MICROSPORIDIOS.

Los microsporidios presentan dos formas parasitarias distintas dependiendo de la fase del ciclo biológico en la que se encuentren: la forma vegetativa que se desarrolla en el interior de la célula hospedadora y la espora, forma infectiva y de resistencia (Canning, 1993).

#### 1.2.2.1. Forma vegetativa de los microsporidios.

La estructura celular vegetativa consta de una membrana plasmática que rodea el citoplasma y a través de la cual el parásito se relaciona con la célula hospedadora bien de manera indirecta, si se encuentra englobado en una vacuola parasitófora, bien directamente, si la membrana está en contacto directo con el hialoplasma de la célula hospedadora. En este último caso, la multiplicación del parásito tiene lugar en el citoplasma de la célula hospedadora. La membrana puede presentar microvellosidades, pliegues o engrosamientos, dependiendo de la especie de microsporidio o de los distintos estados evolutivos en los que éstos se encuentren (Canning y Lom, 1986).

En el citoplasma se pueden localizar diversas vesículas de naturaleza desconocida y estructuras típicas, como por ejemplo ribosomas, el retículo endoplasmático, microtúbulos y el aparato de Golgi. Los ribosomas de los microsporidios se caracterizan por no poseer la fracción 5.8S de la subunidad grande (Vossbrink y Woese, 1986). Así mismo, el aparato de Golgi no está desarrollado en su estructura típica de sáculos apilados, sino que se presenta en forma primitiva constituido por una serie de vesículas que forman un retículo más o menos claro. Como ya se ha mencionado, durante mucho tiempo los microsporidios fueron considerados como protozoos primitivos que no poseían mitocondrias, sin embargo se ha descrito la presencia de un orgánulo mitocondrial remanente llamado mitosoma para el que se han descrito como funciones esenciales la biosíntesis de complejos de sulfoferroproteínas, implicados en el equilibrio de oxidación-reducción (Li y col., 2009; Texier y col., 2010). Otro hecho que caracteriza a los microsporidios es la ausencia de peroxisomas (Vabra, 1977; Cury y col., 1980).

Al carecer de sustancias de reserva y al no ser capaces de realizar la fosforilación oxidativa, dependen en gran medida del ATP de la célula hospedadora, especialmente para la germinación de la espora. Parece ser que estos parásitos han retenido la ruta glucolítica y obtienen la energía a partir de la glucosa de la célula hospedadora mediante una glucólisis anaerobia (Alaux y col., 2010).

El material genético del núcleo se encuentra rodeado por una doble membrana con poros nucleares que la atraviesan. Pueden encontrarse dos tipos de estructura nuclear: mononuclear o binuclear, con dos núcleos gemelos íntimamente unidos por una zona plana en cuya membrana no se encuentran poros. Al carecer de centriolos, los cromosomas de los microsporidios se separan por medio de husos de microtúbulos (Canning, 1988).

El primer genoma completo de microsporidio que se conoció fue el de *E. cuniculi* (2,9 Mbp), que resultó ser el más pequeño de todos los genomas de organismos eucariotas secuenciados hasta ese momento (Katinka y col., 2001). Recientemente se ha secuenciado el genoma completo de *E. intestinalis* (Corradi y col., 2010), depositado en la base de datos MicrosporidiaDB (URL: <http://microsporidiadb.org/micro/>) y en GeneBank (Accesion: PRJNA51607; ID: 51607). Además, se han realizado aproximaciones al estudio sobre el genoma de especies como *Edhazardia aedis*, *Anncaliia algerae*, *E. bienewisi*, *N. ceranae*, *O. bayeri* y *Antonospora locustae* (Texier y col., 2010).

En general, los genomas de estos parásitos se caracterizan por ser compactos y de pequeño tamaño, y pueden variar desde los 2,3 Mbp (*E. intestinalis*) hasta los 24 Mbp (*Octosporea bayeri*). Comparados con otros eucariotas, los genes de los microsporidios son más cortos y el número de proteínas es más reducido. Esta reducción en el número de genes parece estar relacionada con la pérdida de capacidades metabólicas como consecuencia del parasitismo. De esta manera, un parásito como *E. bienewisi*, que posee menos genes implicados en la generación de energía y metabolismo de lípidos, será más hospedador-dependiente que por ejemplo *Octosporea bayeri*, microsporidio que posee una mayor representación de genes asociados al metabolismo, crecimiento celular, transcripción, síntesis de ADN y producción de energía (Texier y col., 2010).

Finalmente, los genomas de los microsporidios comparten una serie de genes altamente conservados y que las diferencias entre ellos se deben a la adaptación a distintos hospedadores y a distintas condiciones ambientales (Texier y col., 2010).

**a) Forma vegetativa de *Nosema ceranae*.**

El parásito *Nosema ceranae* fue descrito y caracterizado por Fries (1996) y con posterioridad ha sido objeto de diversos estudios tanto moleculares (Chen y col., 2009b) como celulares (Gisder y col., 2010b) que han permitido conocer algunas características diferenciales típicas de esta especie.

La membrana plasmática presenta unos 10 nm de grosor y está en contacto directo con el citoplasma de la célula hospedadora. El citoplasma contiene un elevado número de ribosomas libres y un retículo endoplasmático (RER) poco desarrollado. Los merozoitos (estados del ciclo biológico, resultantes de la reproducción asexual por merogonia o esquizogonia), miden de 3,2 a 3,7  $\mu\text{m}$  y contienen un núcleo doble de 3,1 a 3,3  $\mu\text{m}$ . La envoltura nuclear presenta dos membranas con poros y una cisterna perinuclear.

Aunque el ARN de los microsporidios contiene algunos de los rasgos más característicos encontrados en la mayoría de los organismos eucariotas, las subunidades 23 S-like y la 16S-like del ARNr de *N. ceranae* son poco usuales. Estas subunidades carecen de muchos de los

elementos presentes en el ARN de otros eucariotas y son de una longitud significativamente menor (Chen y col., 2009b). Se necesitarían nuevos estudios para determinar cómo afecta esa disminución en la longitud del ARN al ciclo del parásito dentro del hospedador. Por otro lado, los *loci* ribosomales de *N. ceranae* contienen abundantes polimorfismos; es más, el ARNr está presente en múltiples copias que presentan variaciones entre ellas (Cornman y col., 2009). Además, se ha sugerido que en *N. ceranae* podrían estar ocurriendo sucesos de recombinación homóloga, algo sorprendente si se tiene en cuenta que hasta ahora se había considerado que los microsporidios evolutivamente habían perdido el modo de reproducción sexual, lo que en este caso indicaría que algunos de ellos mantienen. Sagastume y colaboradores (2011) sugieren la existencia de un estado diploide transitorio después de la fusión de distintas células que han infectado al mismo hospedador.

#### **1.2.2.2. La espora: forma de resistencia de los microsporidios.**

La forma de resistencia de los microsporidios es la espora (Figura 1.1.) y representa el último estado de desarrollo de su ciclo biológico. Su estructura responde a un proceso de adaptación como elemento de transmisión de la infección tanto a otras células como a nuevos hospedadores. Es de forma ovalada y su tamaño oscila entre 1,2 x 0,8  $\mu\text{m}$  y 20 x 6  $\mu\text{m}$  dependiendo del género. Se distinguen tres partes fundamentales en la espora: la pared, el aparato de extrusión y el esporoplasma.

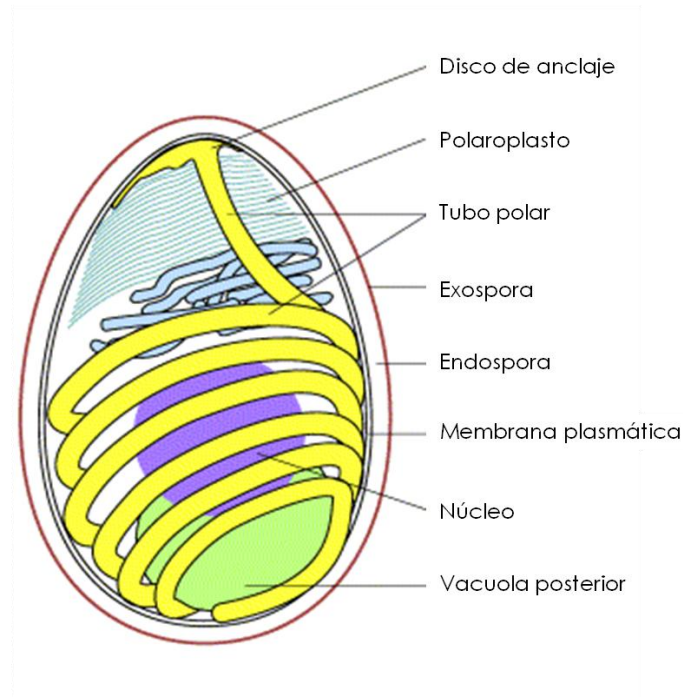
La pared consta de dos capas: una externa electrodensa, denominada exospora y otra interna o endospora. La exospora es de naturaleza proteica, puede ser lisa o presentar distintas ornamentaciones y su espesor varía dependiendo de la especie (15-200  $\mu\text{m}$ ). La endospora es más gruesa (150-200  $\mu\text{m}$ ) y está constituida por quitina asociada a proteína (Wittner y Weiss, 1999).

Hasta ahora se conoce muy poco acerca de los componentes de la pared de la espora de los microsporidios. En la familia *Encephalitozoonidae* se han descrito cinco proteínas, dos en la exospora (SWP1 y SWP2) y tres en la endospora (EnP1, EnP2 o SWP3 y EcCDA asociada a la membrana plasmática). Dentro del género *Nosema* sp. se han descrito cuatro, pertenecientes tanto a la exospora (SWP32), como a la endospora (SWP25, SWP26, SWP30) (Li y col., 2009; Wu y col., 2009).

El esporoplasma está rodeado de una membrana plasmática y contiene ribosomas y un aparato nuclear que puede constar de un solo núcleo o de un núcleo doble (diplocarion).

Además, contiene el denominado aparato de extrusión, característico de los microsporidios, que incluye el sistema polar, el polaroplasto y una vacuola posterior. El sistema polar consta de una cápsula polar o disco de anclaje, que se encuentra en el polo anterior de la espora y en cuyo centro se inserta el tubo polar o filamento polar hueco de 100-150  $\mu\text{m}$  de

diámetro. El tubo polar se dirige hacia la periferia donde se enrolla cerca de la cara interna de la pared de la espora, ocupando aproximadamente la mitad posterior de ésta. El polaroplasto es un conjunto de membranas, sacos o láminas que presentan unas zonas lamelares y otras esponjosas o vesiculares. La vacuola, más o menos desarrollada dependiendo de la especie, se encuentra en la zona posterior de la espora. Presenta un contenido a menudo granuloso y que puede contener inclusiones densas (Wittner y Weiss, 1999).



**Figura 1.1.** Esquema de la ultraestructura de una espora de microsporidio. Modificado de Franzen, 2004.

Como los microsporidios son parásitos intracelulares obligados, la espora es la única forma que puede sobrevivir durante largos periodos en el medio extracelular y favorecer la transmisión. La ingestión accidental de las esporas por un nuevo hospedador es la fuente de infección más común, aunque no se descartan la transmisión transovárica y transplacentaria en algunas especies. Se ha descrito la transmisión transplacentaria en el caso de las infecciones con *E. cuniculi*. También pueden darse infecciones oculares al introducirse las esporas directamente en el ojo. Se han producido infecciones experimentales inoculando por vía nasal lo que indica que la inhalación podría ser otro posible modo de infección. Aunque *E. bienewsi*, *E. hellem* y *E. intestinalis* están ampliamente descritas en humanos, estas y otras especies de microsporidios podrían representar infecciones zoonóticas (Didier y Weiss, 2006).

Aparte de proteger al esporoplasma frente a las condiciones ambientales y mantener estable la presión dentro de la espora evitando la extrusión del tubo polar, estudios recientes describen cómo algunas proteínas de la pared de la espora pueden actuar como ligandos y mediar en el reconocimiento y la adhesión a los glicosaminoglicanos (GAGs) presentes en la superficie de las células hospedadoras (Li y col., 2009).

**a) Forma de resistencia de *Nosema ceranae*.**

Fries y col. (1996) describieron en *A. cerana* y más tarde también se describió en *A. mellifera* (Chen y col., 2009b), que las esporas de *N. ceranae* se forman en el citoplasma de la célula hospedadora sin vacuola parasitófora, característica típica del género *Nosema*. Son de forma ovocilíndrica recta y a veces un poco curvada. En fresco presentan un tamaño medio de 4,7 x 2,7 µm, aunque al fijarlas disminuye el tamaño (3,4 x 1,7 µm).

La pared presenta un grosor de 137-183 nm pero es más delgada en la parte anterior apical (36 nm) dónde cubre el disco de anclaje del filamento polar. Está formada por una exospora densa de tres capas (14 -17 nm), una endospora brillante (134 -118 nm) y una membrana plasmática interna que se conserva de los estados de desarrollo anteriores y que envuelve el esporoplasma.

El filamento polar tiene una anchura de 96-102 nm. Se encuentra en el polo apical de la espora, sujeto al disco de anclaje por el saco polar, el cual tiene forma de paraguas. En su sección transversal se pueden distinguir tres estratos distintos. Una membrana unitaria externa, una capa electrodensa aproximadamente de la misma anchura que la anterior y una capa de 20 nm con estructuras similares a la fibrilla dirigidas hacia el centro, granular y de 35 nm de anchura aproximadamente. El filamento polar se organiza en las partes media y posterior de la espora enrollándose en 20-23 vueltas.

El polaroplasto anterior está formado por lamelas empaquetadas, mide 11 nm de anchura y está conectado estructuralmente con el polaroplasto posterior. Éste último también está formado por lamelas empaquetadas pero en este caso de mayor anchura y menos organizadas, que se extienden hacia abajo hasta aproximadamente un tercio de la espora.

Presenta un doble núcleo que se sitúa en el centro de la espora rodeado por las vueltas del filamento polar y tiene una longitud de 0,9 µm y 0,4 µm de ancho en la línea de aposición.

La mayoría de las esporas maduras poseen un cuerpo posterior separado del núcleo posterior por una zona de citoplasma, que se interpreta como un posterosoma. Está revestido por una membrana unitaria y mide 0,75 µm. Sus estructuras internas parecen cisternas y pueden estar estructuralmente conectadas al filamento polar.

### **1.2.3. CICLO BIOLÓGICO DE LOS MICROSPORIDIOS.**

Los microsporidios presentan un ciclo biológico intracelular que se divide en tres fases: infectiva, vegetativa y esporogonia (Figura 1.2.).

En la primera fase, la infectiva, el hospedador ingiere las esporas, y debido al pH y a la presencia de ciertos iones en el digestivo (Weidner, 1976; Weidner, 1991; Weidner y Halonen,

1993; Weidner y col., 1997), la presión ejercida en el interior de la espora y el engrosamiento del polaroplasto provocan la extrusión del tubo polar por el punto en el que la cubierta de la espora tiene un menor grosor, que como vimos anteriormente suele ser el apical o subapical. Cuando el tubo polar extruye, perfora la membrana de la célula hospedadora y penetra en la misma. El esporoplasma migra a través del tubo polar hasta el citoplasma de dicha célula hospedadora para comenzar su ciclo biológico (Canning y Lom, 1986; Canning, 1993; Martínez Fernández, 1995).

Se ha descrito que la extrusión del tubo polar es un proceso osmótico en el que las enzimas digestivas del hospedador alteran la cápsula polar favoreciendo la entrada de agua al interior de la espora a través de canales intramembranosos similares a las acuaporinas. Tanto el polaroplasto como la vacuola posterior captan el agua por lo que se hinchan y aumentan su tamaño, aumentando a su vez la presión en el interior de la espora. Esta presión induce a la rotura de la cápsula, la extrusión del tubo polar y la consiguiente salida del esporoplasma (Vabra, 1977; Weidner y col., 1984; Texier y col., 2010).

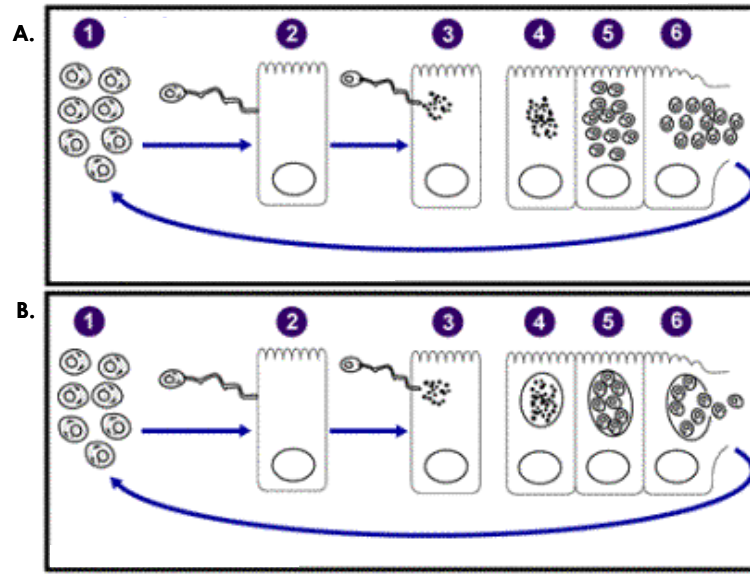
Se han propuesto distintas hipótesis para explicar los mecanismos por los que los microsporidios pueden invadir la célula hospedadora. La más común presenta al tubo polar como una "aguja" que, debido a la fuerza mecánica producida por la extrusión, atraviesa la membrana de la célula hospedadora y dirige el contenido de la espora hacia el mismo. También se ha observado que el extremo del tubo polar extruido, y por tanto el contenido de la espora, pueden introducirse en la célula hospedadora por mecanismos de endocitosis en vez de ser transportados a través del túbulo. Por otro lado, se ha postulado cómo la célula hospedadora puede fagocitar la espora y digerirla, provocando su extrusión en el citoplasma (Li y col., 2009; Texier y col., 2010). Recientemente se ha sugerido que la infección puede ser mediada por una interacción molecular en la que la espora se une a los GAG de la membrana de la célula hospedadora antes de la extrusión (Williams y Keeling, 2011).

Los caminos de señalización que llevan a la germinación de la espora (extrusión del tubo polar) aún no se conocen muy bien. Al parecer, algunos componentes del tubo polar y de la pared de la espora pueden estar implicados en el reconocimiento de tejidos, y por lo tanto, en el comienzo del proceso de invasión de la célula hospedadora. Por ejemplo, las familias de proteínas del tubo polar PTP1, PTP2 y PTP3, identificadas en varias especies de microsporidios, parecen ser esenciales para el ensamblaje y funcionamiento del mismo. Además, PTP1 puede interactuar con el receptor de manosa de la célula hospedadora. Por otro lado, se cree que las esporas utilizan GAG como receptores de las células hospedadoras para la adhesión e invasión de las mismas, a través de la posible interacción con una importante proteína de la pared de la espora: EnP1 (Texier y col., 2010).

En la segunda fase del ciclo biológico, la fase vegetativa, se produce una proliferación por merogonia (Figura 1.2.). Una vez en el interior de la célula hospedadora, el esporoplasma crece y forma merontes. Los merontes son células redondas e irregulares de membrana simple que pueden presentar un núcleo aislado o doble. Éstos experimentan una multiplicación



vegetativa (merogonia o esquizogonia) que en ocasiones puede ser una simple fisión binaria. En muchas especies de microsporidios aparecen a lo largo de esta fase formas plasmoidales plurinucleadas.



**Figura 1.2.** Esquema general del ciclo biológico intracelular de los microsporidios sin vacuola parasitófora (A) o con ella (B). 1: Esporas infectantes; 2: Extrusión del filamento polar; 3: Fase infectiva; 4: Merogonia; 5: Esporogonia. 6: Liberación de nuevas esporas al medio. Modificado de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/>.

En último lugar se produce la fase de diferenciación o esporogonia en la que, a partir de los estados morfológicos de la fase vegetativa (los merontes), se forman los esporontes o plasmidios esporogoniales (Figura 1.2.). Éstos sólo pueden diferenciarse de los merontes a nivel ultraestructural, por el mayor grosor de la membrana que los rodea. Además presentan en su superficie una cubierta electrodensa a partir de la cual se forma la exospora. Los esporontes dan lugar a esporoblastos por atrofia y división de sus núcleos. En su formación, los esporoblastos se rodean de citoplasma y de una pared gruesa, y con posterioridad, pasan a ser esporas en un proceso de metamorfosis compleja que en algunos géneros de microsporidios puede comprender más de una secuencia en la fase vegetativa o en la esporogonia.

Dependiendo de la especie de microsporidio, las esporas podrán producirse libres en el citoplasma de la célula hospedadora o, en los casos en los que los esporontes se encontraran rodeados por una membrana unitaria denominada pared panesporoblástica, empaquetadas en vesículas esporóforas (vacuola parasitófora).

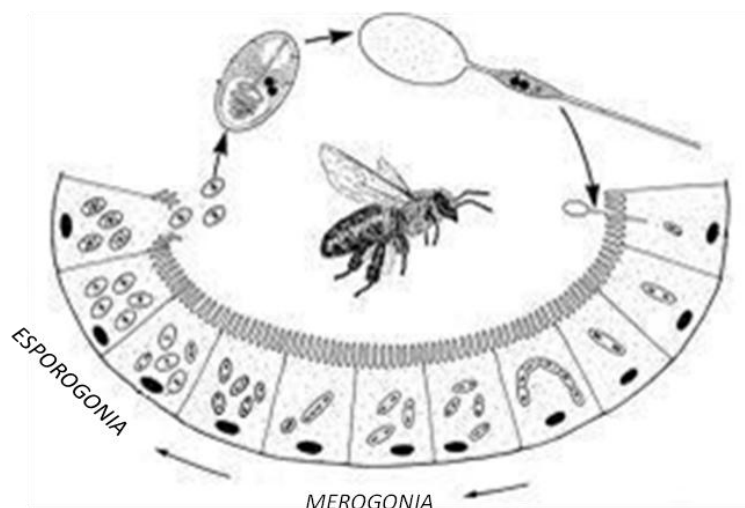
La duración del desarrollo completo incluyendo la formación de las esporas puede oscilar entre las 24 y las 48 horas postinfección. Las esporas recién formadas rompen la pared de la célula hospedadora y se diseminan por otras partes del organismo hospedador, o bien salen al exterior a través de las heces, la orina o el tracto respiratorio. Algunos estudios *in vitro*

demuestran que las esporas de *Encephalitozoon* sp. pueden multiplicarse en el interior de la célula hospedadora sin activar vía apoptótica de la p53 (del Aguila y col., 2006). Se ha demostrado que las esporas de algunas especies sobreviven y mantienen su capacidad de infectar durante meses (Canning, 1988; Wittner y Weiss, 1999).

#### 1.2.3.1. Ciclo biológico de *N. ceranae*.

La infección de las abejas se produce al ingerir éstas las esporas maduras de *N. ceranae*, debido normalmente a comportamientos de limpieza o trofalaxia (Higes y col., 2010c). Estas esporas extruyen en el intestino medio infectando las células epiteliales. En el caso de *N. ceranae*, la extrusión de las esporas parece ocurrir *a priori* sin ningún contacto de éstas con la célula hospedadora (Gisder y col., 2010b).

Distintos autores han estudiado el ciclo biológico de este parásito (Figura 1.3.) en muestras histológicas y, según mantienen, puede presentar más de un ciclo merogonial. Observan merontes con doble núcleo, que se dividen por fisión binaria simple como en la mayoría de las especies del género *Nosema* sp. Cada esporonte se divide al menos una vez dando lugar a estados que evolucionan a esporoblastos. Al parecer, todos los estados del ciclo biológico de *N. ceranae* son diplocarióticos, característica también típica del género *Nosema* sp. (Fries y col., 1996; Chen y col., 2009b) y todos se desarrollan en contacto directo con el citoplasma de la célula hospedadora. El ciclo completo se desarrolla en menos de tres días (Higes y col., 2010c).



**Figura 1.3.** Esquema general del ciclo biológico intracelular de *N. ceranae*. Modificado de <http://scientificbeekeeping.com/the-nosema-twins-part-1/>

Al estudiar el ciclo *in vitro*, se observó que éste se correspondía con el descrito para el género *Nosema* sp., y para *N. apis* y *N. ceranae* en particular, con estados diplocarióticos y merogonia y esporogonia simples. Además, se pudieron observar merontes en forma de huso similares a los descritos en *Nosema helminthorum*, que no se habían podido identificar en los cortes para microscopio electrónico (Gisder y col., 2010b).

#### 1.2.4. EPIDEMIOLOGÍA DE LOS MICROSPORIDIOS.

La microsporidiosis en humanos está presente en todo el mundo con un índice de prevalencia que varía de 0 a 50% dependiendo de la región geográfica, el método de diagnóstico y las características demográficas de la población estudiada. Antes de la aparición de las terapias antirretrovirales, la prevalencia de la microsporidiosis tendía a ser más alta en individuos infectados por el VIH. De hecho, en regiones de Sudamérica, África y Asia, donde la terapia antirretroviral aun no se aplica, la microsporidiosis se ha identificado en pacientes infectados por VIH enfermos de SIDA junto con factores de riesgo adicionales como condiciones sanitarias deficientes y exposición a animales. En la actualidad la microsporidiosis también se está diagnosticando en pacientes inmunocompetentes como viajeros, niños, ancianos y pacientes transplantados (Didier y Weiss, 2006; Galván y col., 2011).

##### 1.2.4.1. Epidemiología de *N. ceranae* y *N. apis*.

Originalmente se consideró que *N. ceranae* estaba restringida a la abeja asiática, *A. cerana* como único hospedador (Fries y col., 1996; Fries, 1997). Sin embargo, más recientemente se han descubierto casos de infecciones cruzadas entre las dos especies de abeja, producidas de forma natural. Huang y col., detectaron en Taiwan a *N. ceranae* parasitando abejas de la especie *A. mellifera* (Huang y col., 2007). El hecho de que estas abejas cohabitaran en el mismo colmenar con abejas de la especie *A. cerana* hace pensar que el parásito podría haber logrado sobrepasar la barrera específica del hospedador. Casi simultáneamente *N. ceranae* se describió por primera vez en Europa parasitando también colmenas de *A. mellifera* en España (Higes y col., 2006) y más tarde en Francia y Alemania (Fries y col., 2006). Teniendo en cuenta la dificultad que supone el distinguir entre sí ciertas especies de microsporidios, aún utilizando microscopía electrónica (Larsson, 1986; Rice, 2001) no resulta raro pensar que quizás algunas de las primeras observaciones de microsporidios en *A. cerana* (Singh, 1975) o incluso en *A. mellifera* (Yacobson y col., 1992) correspondieran en realidad a *N. ceranae*. Además, *N. ceranae* infecta a muchas otras especies del género *Apis* (Higes y col., 2010c) y recientemente también se ha detectado *N. ceranae* infectando abejorros (*Bombus* sp.) (Plischuk y col., 2009).

En Europa, se ha publicado la detección de *N. ceranae* en España, Francia, Alemania, Suiza, Dinamarca, Finlandia, Grecia, Hungría, Holanda, Reino Unido, Italia, Serbia, Polonia,

Eslovenia, Bosnia Herzegovina y Suecia (Higes y col., 2010c) (Figura 1.4.). Teniendo en cuenta que *N. ceranae* se ha encontrado en distintas poblaciones de abejas de Europa, separadas entre sí geográficamente, no parece que la introducción de éste parásito en la nueva especie de hospedador (*A. mellifera*) sea algo reciente. Se puede estudiar la evolución de la infección desde su origen utilizando muestras ya almacenadas de abejas infectadas por estos microsporidios, ya que podrían haber estado existiendo como infecciones paralelas desde hace un tiempo considerable. Analizando muestras, tanto históricas (antes de 2003) como recientes (después de 2003), Klee y col. demostraron en 2007 que *N. ceranae* es un patógeno emergente que en la actualidad se encuentra parasitando a *A. mellifera* en la mayor parte del mundo. A pesar de que no se ha podido precisar el momento exacto del salto de un hospedador a otro, este trabajo ha permitido detectar la presencia del parásito en Europa desde hace al menos ocho años. Los resultados de Paxton y col., (2007) sugieren que *N. ceranae* ha estado presente en Finlandia por lo menos desde 1998, lo que implica que perfectamente podría haber estado en el resto de Europa durante la última década. Así mismo, se ha detectado la presencia de *N. ceranae* en muestras españolas que datan del año 2000 (Botias y col., 2012), cuatro años antes de la aparición de los síntomas del despoblamiento de las colmenas (Higes y col., 2005).

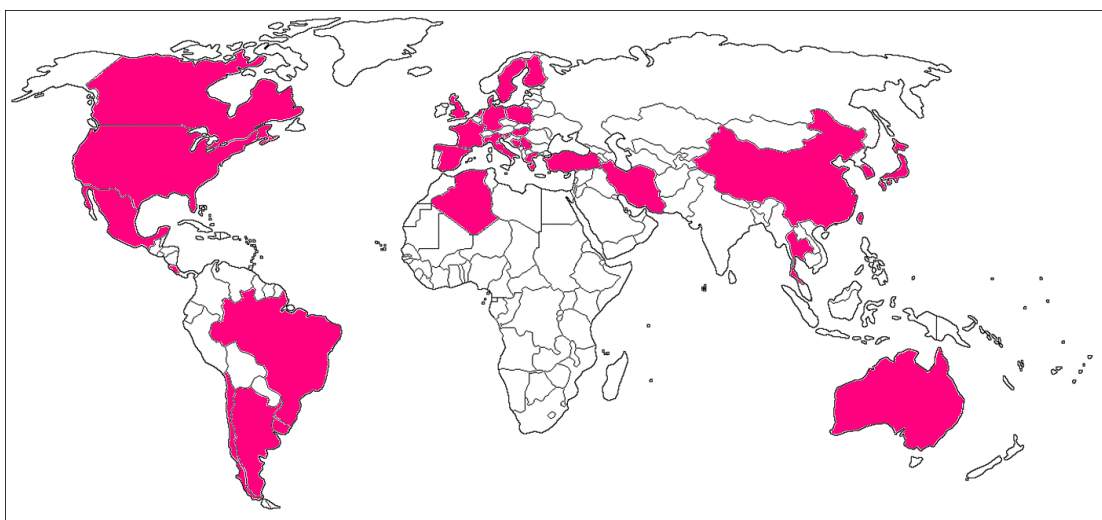
En España se han realizado estudios epidemiológicos que indican que la prevalencia de *N. ceranae* en los colmenares profesionales españoles es de un 40%, lo que implicaría que el parásito se encuentra en niveles epizooticos en la península (Botias y col., 2012).

También se ha sugerido la presencia del parásito en Estados Unidos desde 1995 (Chen y col., 2008), aunque el desorden del colapso de las colmenas (CCD) no se empezó a tener en cuenta hasta el 2007 (Bromenshenk y col., 2010). *N. ceranae* se ha descrito además en Canadá (Williams y col., 2008b). Así mismo, se ha detectado al parásito en América central, más concretamente en Costa Rica (Calderón y col., 2008) y en Méjico (Guzman-Novoa y col., 2011), así como en Sudamérica, dónde se describió en Argentina (Sarlo y col., 2008; Medici y col., 2012), en Chile (Martínez y col., 2012) y en Brasil (Klee y col., 2007). En Uruguay se ha detectado una muestra anterior a 1990 infectada por *N. ceranae* (Invernizzi y col., 2009) (Figura 1.4.).

En Asia, aparte de la primera identificación de *N. ceranae* en Taiwan (Huang y col., 2007) el parásito se ha detectado más recientemente en colonias de *A. mellifera* de Turquía (Whitaker y col., 2011), Irán (Nabian y col., 2011), Tailandia (Chaimanee y col., 2010; Suwannapong y col., 2011), Corea (Hong y col., 2011) y Japón (Yoshiyama y Kimura, 2011) (Figura 1.4.).

Así mismo se ha descrito *N. ceranae* infectando abejas y contaminando miel en Australia (Giersch y col., 2009) y en el norte de África (Higes y col., 2009b). Aún no se conoce la vía por la cual este parásito se introdujo en Europa pero parece probable que fuera a través de la importación de abejas reina infectadas (Korpela, 2002). La abeja occidental *A. mellifera*, económicamente hablando, es la especie más importante de las nueve que se han descrito dentro del género *Apis*. Se ha transportado desde Europa, África y Oriente Próximo a través de todo el mundo debido a su utilización para la apicultura. El ácaro ectoparásito *Varroa destructor*

asociado con *A. cerana*, saltó la barrera del hospedador comenzando a parasitar *A. mellifera* y se introdujo del mismo modo en Finlandia (Korpela, 1999) alcanzando pronto el estatus de plaga. Hay que resaltar que, de ser cierto el ritmo de expansión mundial que se ha descrito para *N. ceranae*, éste es mucho más rápido que el de *V. destructor*, del que se piensa que pudo durar medio siglo (Breguetova, 1953; Samsinak y Haragsim, 1972; Hicheri, 1978; Sanford, 2001). Dado que las infecciones descritas en Japón aparecen distribuidas en distintas zonas siguiendo un patrón discontinuo, parece posible que en este caso *N. ceranae* también haya sido introducida en este país por la importación de productos apícolas contaminados o abejas reina infectadas (Yoshiyama y Kimura, 2011).



**Figura 1.4.** Países en los que se ha descrito la presencia de *Nosema ceranae*.

También se han encontrado esporas infectivas en regurgitados de abejaruco común (*Merops apiaster*), pájaro insectívoro cuya principal presa son los Himenópteros, sobre todo *A. mellifera*, y más concretamente las abejas pecoreadoras que son las que suelen presentar una mayor carga parasitaria. Los abejarucos normalmente expulsan sus regurgitados cerca del nido y de las áreas de alimentación, pero también pueden hacerlo durante el vuelo. El hecho de que sean aves migratorias (con áreas de cría en Europa y Asia, y áreas de hibernación en África e India) los perfila como otra posible vía de dispersión, además del transporte de las colmenas con fines comerciales (Higes y col., 2008b; Valera y col., 2011).

### 1.2.5. MECANISMOS DE TRANSMISIÓN DE LOS MICROSPORIDIOS.

Las vías de transmisión de los microsporidios están poco documentadas pero ciertos estudios epidemiológicos evidencian que las infecciones pueden darse por las vías respiratoria, sexual, congénita e incluso por inoculación traumática en el caso de las infecciones oculares (Ghosh y Weiss, 2009). Así mismo, el hecho de que los microsporidios que infectan humanos se

encuentren también parasitando varios grupos animales puede sugerir un potencial de transmisión zoonótica por parte de estos organismos (Texier y col., 2010). Por otra parte, debido a la identificación de microsporidios en alimentos y en agua de bebida, éstos han sido incluidos en la categoría B tanto de la lista de patógenos de biodefensa del NIH (*National Institutes of Health*) como de la lista de patógenos de prioridad del NIAID (*National Institute of Allergy and Infectious Diseases*), ambos de Estados Unidos. Así mismo son considerados contaminantes microbianos candidatos (CCL-1 y 2) de transmisión por agua en la lista de la EPA (*Environmental protection Agency*) del mismo país (Didier y Weiss, 2006; Ghosh y Weiss, 2009; Texier y col., 2010).

#### 1.2.5.1. Mecanismos de transmisión de *N. ceranae* y *N. apis*.

La transmisión de los dos parásitos (*N. apis* y *N. ceranae*) es horizontal, vía fecal-oral, por ingestión de las esporas a través de la comida o del agua (Fries, 1988b; Fries y col., 1996). En el caso particular de *N. apis*, al causar disentería, la transmisión también puede ser debida a la ingestión de las heces de abejas enfermas por parte de las sanas (Morse y col., 1997). También se ha descrito la transmisión de *N. ceranae* por el intercambio de comida entre abejas (Smith, 2012)- Por eso habrá que tener en cuenta la trofalaxia como una importante vía de transmisión de la nosemosis entre abejas de la misma o de distintas colonias (Higes y col., 2010c).

Se ha descrito como *N. ceranae* puede transmitirse de manera horizontal de las abejas obreras encargadas de la alimentación de la reina a ésta última (Higes y col., 2009a; Higes y col., 2010c). Por otro lado, se propone la hipótesis de que los zánganos infectados son un medio de transmisión de la enfermedad dentro de las colonias y entre distintas colonias dado que estas abejas vuelan de unas a otras (Traver y Fell, 2011a). Así mismo, ciertos experimentos sugieren una posible transmisión vertical de *N. ceranae*, ya que se han encontrado infectados los ovarios y la espermateca de las abejas reina, tejidos en los que no se halló infección alguna en el caso de *N. apis* (Traver y Fell, 2012).

Se ha detectado la presencia de esporas infectivas de *N. ceranae* en el polen corbicular de las abejas pecoreadoras, principal fuente de alimentación de las larvas en desarrollo y de las abejas adultas (Higes y col., 2008c). Además, el hecho de que utilizando la técnica molecular de la PCR se haya detectado *N. ceranae* en las glándulas hipofaríngeas y salivales de las abejas obreras, puede sugerir que la jalea real (secretada por estas glándulas) utilizada para alimentar a la reina y a las larvas, podría ser otro vehículo para la transmisión del parásito dentro de las colonias (Cox-Foster y col., 2007; Chen y col., 2009b). Malone y colaboradores (2001) observaron que las esporas de *N. apis* se mantenían viables durante meses en la miel y varios días en agua o sirope azucarado con el que se alimentaba a las abejas. Por otra parte, se ha observado cómo las abejas pueden ingerir esporas al masticar la cera que las cubre en el momento de la emergencia de los adultos (Alaux y col., 2010) y también se ha descrito la contaminación con estas esporas de material utilizado por los apicultores (Higes y col., 2010c).

Por último, como ya se ha mencionado anteriormente, es de gran importancia la transmisión de este parásito tanto a través de las aves migratorias (*Merops apiaster*), como por el comercio mundial con productos y material de apicultura, así como de abejas reina y sus obreras para su utilización en polinización (Higes y col., 2010c).

#### 1.2.6. PATOLOGÍA Y PATOGÉNESIS DE LOS MICROSPORIDIOS.

La enfermedad que causa la infección por microsporidios se denomina microsporidiosis. Los microsporidios se reconocían principalmente como patógenos de hospedadores animales, debido a su amplia distribución en la naturaleza (Shadduck y Pakes, 1971; Canning y Lom, 1986). Algunos de estos patógenos han demostrado un gran impacto económico tanto en la apicultura (*N. ceranae* y *N. apis*) como en la sericultura (*N. bombycis*) y la acuicultura (*Loma salmonae* en salmónidos y *Thelohanía* spp. en gambas) (Texier y col., 2010).

Recientemente, los integrantes de la clase *Microsporidia* han adquirido importancia como patógenos emergentes en humanos al describirse cada vez con más frecuencia como causantes de infecciones oportunistas en pacientes inmunosuprimidos ya sea infectados por el virus del SIDA o aquellos que han recibido un transplante de órgano o quimioterapia. Además parece que también pueden causar infecciones gastrointestinales y oculares en individuos inmunocompetentes (Ghosh y Weiss, 2009; Galván y col., 2011).

Se han descrito 14 especies, englobadas en 8 géneros, relacionadas con patologías humanas: *Encephalitozoon*, *Enterocytozoon*, *Nosema*, *Vittaforma*, *Pleistophora*, *Trachipleistophora*, *Ancaliia* y *Microsporidium*. Este último género comprende a todos los microsporidios de difícil clasificación taxonómica y que no pueden incluirse con certeza en ninguno de los géneros descritos. Las infecciones que producen pueden ser desde asintomáticas hasta causar enfermedades graves e incluso la muerte dependiendo de la virulencia del parásito y de la eficacia de la respuesta inmune del hospedador (Didier y Weiss, 2006).

La especie que parasita al hombre con mayor frecuencia, *Enterocytozoon bienersi*, se describió en 1985 (Desportes y col., 1985) como causante de diarrea en pacientes inmunocomprometidos. Desde entonces se ha demostrado que, además de al tracto intestinal, también infecta al hígado (por una posible diseminación desde el intestino) y a los pulmones (vía aerógena a través de aerosoles).

Después de *E. bienersi*, la especie de microsporidio más prevalente en el hombre es *Encephalitozoon intestinalis* que se describió en 1993 (Cali y col., 1993) como *Septata intestinalis* (posteriormente reclasificado), también como causante de diarrea en pacientes inmunocomprometidos.

Dentro del género *Encephalitozoon* también existen otras dos especies que causan infecciones en el hombre: *E. hellem* y *E. cuniculi*. Ambas son morfológicamente idénticas, aunque se diferencian tanto bioquímica como antigénicamente. Aún así, es probable que en los primeros estudios en los que se citaba a *E. cuniculi* como agente causal de la patología en el hombre, en realidad se tratara de *E. hellem* (Didier y col., 1991; Visvesvara y col., 1994). *E. hellem* se encuentra principalmente en los epitelios corneal y conjuntivo de pacientes con SIDA (Didier y col., 1991).

#### 1.2.6.1. Patología y patogénesis de *N. ceranae* y *N. apis*.

La nosemosis es una enfermedad de las abejas causada por las especies del género *Nosema* sp. Estas especies de microsporidios producen esporas que se transmiten de una célula a otra por germinación *in situ*, lo que les permite diseminar la infección dentro del hospedador. Tanto *N. apis* como *N. ceranae* infectan las células epiteliales ventriculares del intestino de las abejas adultas (Fries, 1988a; Fries y col., 1996). Sin embargo, mediante la técnica de PCR también se han detectado *N. ceranae* en otros tejidos como los túbulos de Malpigio, las glándulas hipofaríngeas, salivares y mandibulares, el saco del veneno, los cuerpos grasos y el cerebro, lo que sugiere que estos tejidos también pueden ser infectados por esta especie y actuar como reservorios de la infección (Chen y col., 2009b; Gisder y col., 2010a; Copley y Jabaji, 2012).

Cuando *N. ceranae* infecta a *A. cerana* (su hospedador original), las áreas o células infectadas del ventrículo normalmente se encuentran aisladas y rodeadas de tejido aparentemente sano. Los parásitos proliferan en el interior de estas células que acaban por lisarse, liberando las esporas maduras en el lumen del intestino. El hecho de que las células del epitelio intestinal infectadas puedan estar muertas o en proceso de muerte celular, conlleva la muerte prematura por inanición de las obreras (Higes y col., 2008a). En este caso, las esporas no extruyen en el interior de la célula hospedadora, por tanto *N. ceranae*, sólo disemina la infección entre distintos hospedadores. Sin embargo, cuando *N. ceranae* infecta *A. mellifera*, presenta un patrón de extrusión *in situ* similar al descrito anteriormente para *Nosema* sp. Según Fries y col. (1996) estas esporas pueden extruir y reinfectar otras células o pueden ser liberadas por las heces. Todos estos efectos descritos se dan en abejas infectadas tanto de forma natural (García-Palencia y col., 2010) como experimentalmente (Higes y col., 2007).

Así mismo, al estudiar la expresión de los genes en abejas infectadas por *N. ceranae*, se ha observado una disminución en la expresión de ciertos genes relacionados con rutas de señalización implicadas en la homeostasis de los tejidos, así como procesos de multiplicación y diferenciación celulares, situación que llevaría a un aumento de la mortalidad en caso de que la infección fuera continua (Dussaubat y col., 2012).



Si se lograra establecer que la infección por *N. ceranae* tiene efectos distintos a los que produce *N. apis*, podría esclarecerse una posible relación entre la reciente detección de *N. ceranae* en Europa (Fries y col., 2006), y el aumento de la detección de esporas de *Nosema* en colmenas que no presentan los signos característicos asociados a la presencia de *N. apis*. Dicha presencia se caracteriza en las formas agudas por temblores en los zánganos, abejas con abdómenes dilatados, disentería (detectada por manchas marrones en distintas partes de la colmena), abejas enfermas o muertas alrededor de las colmenas y alteraciones en el comportamiento de vuelo, así como la sustitución de la abeja reina acompañada de una disminución de la producción de nuevas generaciones y la consecuente disminución del tamaño de la colonia, las cuales se dan particularmente en primavera (Fries, 1997; Higes y col., 2010c). Las abejas infectadas con *N. ceranae* no presentan signos clínicos externos de enfermedad ("nosemosis seca"). Sólo cuando se aísla el ventrículo de abejas infectadas éste se observa reducido y de color blanquecino (Higes y col., 2007). Además, el patrón epidemiológico y la patología que causa esta especie también es distinta a las de *N. apis*. Por ello, la infección debe confirmarse mediante microscopía óptica (Fries y col., 1996). Actualmente se considera a este parásito como el agente etiológico causante de una enfermedad emergente en *A. mellifera* que ha dado en llamarse nosemosis tipo C, en contraposición con la de tipo A causada por *N. apis* que se ha descrito previamente (Higes y col., 2010c).

**a) Virulencia de la infección.**

El análisis retrospectivo de muestras de abejas con esporas de microsporidios sugiere un proceso por el que *N. ceranae* parece reemplazar gradualmente a *N. apis* (Paxton y col., 2007). Valera y colaboradores, al estudiar la presencia de esporas viables de estos microsporidios en los regurgitados del abejaruco común (*Merops apiaster*) en Europa y Asia, encontraron una mayor prevalencia de *N. ceranae* en comparación con la de *N. apis* el parásito original de *A. mellifera* (Valera y col., 2011). Así mismo, históricamente las abejas de la miel de Estados Unidos habían estado infectadas de manera predominante por *N. apis*, pero en la actualidad las infecciones por *N. ceranae* son las predominantes (Runckel y col., 2011), algo similar a lo descrito en Chile (Martínez y col., 2012).

A partir de estudios realizados sobre infecciones cruzadas entre las dos especies hospedadoras, se puede inferir que, a pesar de que los dos parásitos pueden infectar a las dos especies de abeja, el desarrollo de *N. apis* en su hospedador no específico, la abeja asiática, es peor que el de *N. ceranae* en la abeja europea (Fries y Feng, 1995; Fries, 1997; Chaimanee y col., 2010). Además, el hecho de que la infección por *N. apis* esté restringida al epitelio gastrointestinal mientras que *N. ceranae* infecta a numerosos tejidos, puede estar relacionado con una mayor virulencia de ésta última (Gisder y col., 2010a).

Para estudiar la mortalidad causada por cada una de estas dos especies de microsporidios se han realizado diversos experimentos. Al comparar los efectos de la infección

experimental con esporas de *N. ceranae* de colmenas de *A. mellifera*, se observó un aumento significativo de la mortalidad de las abejas infectadas frente a un control de abejas sin infectar (Higes y col., 2007). Paxton y sus colaboradores (2007) también observaron una disminución del tiempo de vida producida por *N. ceranae*, aunque en este caso no fue tan acusada, puede que debido al pequeño número de colmenas utilizadas para realizar el estudio. Por otro lado, Malone y Stefanovic realizando un experimento similar pero en este caso infectando con *N. apis*, no lograron establecer una relación significativa entre la longevidad de las abejas y la dosis de esporas administrada (Malone y Stefanovic, 1999). Todo esto podría indicar que *N. ceranae* presenta una mayor patogenicidad que *N. apis* en las colmenas de abejas. Sin embargo, cuando se realizó un experimento similar inoculando ambas especies de microsporidio, no se observó una ventaja competitiva de ninguna de ellas al estudiar las abejas de manera individual (Forsgren y Fries, 2010). Las condiciones de las esporas (almacenamiento, purificación, viabilidad e identificación) y de las abejas (edad de las recién nacidas sin infectar) utilizadas en los distintos experimentos podrían explicar la gran variabilidad de los resultados que se ha encontrado en éstos (Higes y col., 2010c).

En Finlandia, se describió un aumento en la presencia de *N. ceranae* en relación con *N. apis*, asociada a una mayor carga parasitaria de esporas por abeja (Paxton y col., 2007). En este país, todas las infecciones recientes causadas por *Nosema* se debían a *N. ceranae* bien sola, bien coinfectando junto a *N. apis*. Algo similar ocurrió al estudiar aislados de abejas españolas infectadas por este género (Higes y col., 2006). Según Bailey, una abeja que ha desarrollado completamente una infección por *N. apis*, alberga en su ventrículo  $30\text{-}50 \times 10^6$  esporas (Bailey, 1981). Más tarde, Paxton y colaboradores (2007) describieron un número de  $1\text{-}34 \times 10^6$  esporas de *N. apis* por abeja infectada, número dentro del rango descrito por Bailey. Sin embargo, en el mismo experimento encontraron un número de esporas de *N. ceranae* bastante mayor ( $1\text{-}158 \times 10^6$  esporas/abeja) en *A. mellifera* infectadas con este parásito.

En el mismo estudio, se observó que las esporas de *N. ceranae* inicialmente proliferaban más lentamente que las de *N. apis*, de forma que el número de esporas de ambas especies no se igualaba hasta 14 días después de la infección. El experimento no continuó más allá de las dos semanas, pero la curva de crecimiento que se obtuvo para las esporas de *N. ceranae* sugiere que éstas habrían seguido proliferando, mientras que la curva de crecimiento de las esporas de *N. apis* habría alcanzado la fase de meseta ya en el día 10 (Paxton y col., 2007).

Aparte, se han desarrollado varios ensayos para determinar los efectos del tiempo, de la temperatura y de la desecación sobre el potencial biótico (la máxima capacidad reproductiva de una población en condiciones ambientales óptimas) y la viabilidad de las esporas de ambas especies de parásito. Estos estudios demuestran una mayor adaptabilidad de *N. ceranae* a las altas temperaturas. Martín-Hernández y col. demostraron en 2009 como *N. ceranae* no sólo posee un mayor potencial biótico (determinado por el número de esporas contadas) a distintas temperaturas (25 y 37 °C), sino que infecta un mayor número de células y tiene un desarrollo más rápido que *N. apis*, llegando a completar su ciclo en menos de 48 horas. En otro estudio, utilizando microscopía electrónica de transmisión se observó como a 37 °C las esporas de *N. apis*

aparecían degeneradas y no se encontraban estados de desarrollo inmaduros hecho que no ocurría en el caso de *N. ceranae* (Higes y col., 2010a). Esta adaptación de *N. ceranae* a rangos más amplios de temperatura puede explicar la falta de estacionalidad que se ha descrito para este parásito. Así mismo, las diferencias en la infección y proliferación de ambos microsporidios podrían explicar la mayor mortalidad de las abejas infectadas por *N. ceranae*.

Por otro lado, en 2009 Fenoy y col., utilizando una doble tinción Sytox green-DAPI, estudiaron la viabilidad de las esporas de *N. ceranae* a 60 °C, temperatura a la que se derrite la cera de los peines de las colmenas para poder reutilizarlos, y a 35 °C, la habitual en el interior de las colmenas, necesaria para que las abejas inmaduras completen su metamorfosis. En ninguno de los casos observaron una disminución de la viabilidad, lo que podría dar idea del potencial de diseminación de dichas esporas dentro de las colmenas y entre los distintos estados de desarrollo de las abejas que las pueblan. Sí que observaron una considerable disminución de la viabilidad de las esporas congeladas a -20 °C utilizando distintas condiciones de crioconservación (RPMI o SBF con DMSO al 10 %) y a 4 °C en PBS 1x, dato a tener en cuenta para su uso y almacenamiento en los laboratorios. Gisder y colaboradores (2010a) obtuvieron resultados similares, pues observaron una disminución de la capacidad de germinación de las esporas de *N. ceranae* a 4 °C, disminución que no se observó en el caso de las esporas de *N. apis*.

Continuando con el mismo experimento, para estudiar los efectos de la desecación sobre las esporas, Fenoy y col. (2009) evaluaron su viabilidad al ser secadas al aire a temperatura ambiente, observando que ésta se mantenía hasta una semana. Previamente, Malone y col. (2001), habían observado una pérdida de viabilidad en esporas de *N. apis* secadas al aire pero mantenidas en este caso a temperaturas de 40, 45 y 49 °C durante 3, 5 y 45 días.

Todos estos datos acerca de la termotolerancia de *N. ceranae* deberían tenerse en cuenta ya que, como se ha descrito para otras especies, el incremento de la temperatura en la Tierra debido al cambio climático pudo favorecer a los patógenos y a las plagas de las abejas, ampliando no sólo su distribución sino también su estacionalidad y la severidad de las enfermedades que causan (Martin-Hernandez y col., 2009).

Actualmente la incidencia de *N. ceranae* y *N. apis* no sigue el mismo patrón en todas las regiones de Europa. *N. ceranae* parece ser más prevalente en Dinamarca, Grecia, Italia, Serbia y España, mientras que *N. apis* se observa con mayor frecuencia en Suecia, Reino Unido y Alemania (Gisder y col., 2010a). En Estados Unidos se detecta la misma tendencia por la que las infecciones por *N. ceranae* dominan en los climas más cálidos mientras que *N. apis* suele ser más prevalente en los fríos (Williams y col., 2008a). Esto podría explicarse por la disminución de la capacidad de germinación de las esporas de *N. ceranae* sometidas a temperaturas moderadamente frías (4°C) que se ha citado anteriormente. Esta reducción en la virulencia a bajas temperaturas podría suponer una desventaja para *N. ceranae* en aquellas zonas climáticas en las que los inviernos son más fríos. Así mismo, dado que en estas zonas las

temperaturas estivales no suelen sobrepasar los 33°C, la tolerancia a las altas temperaturas y a la desecación que presenta el parásito en climas cálidos se neutralizaría.

Por todo lo comentado anteriormente, los factores climáticos estarían desempeñando un papel fundamental en la expansión, la distribución geográfica, la estacionalidad y la severidad de las infecciones causadas por *N. ceranae* (Higes y col., 2010c).

**b) Estacionalidad de la infección.**

Una mayor patogenicidad de *N. ceranae* y su termotolerancia podrían ser la explicación para el inusual curso de la infección y el aumento de la mortalidad de las colonias que se han descrito en el centro y sur de Europa durante los últimos años, por los que la nosemosis no se da sólo en primavera sino durante todo el año y asociada a grandes pérdidas en las colonias y en la producción de miel (Higes y col., 2005; Higes y col., 2006; Imdorf y col., 2006; Higes y col., 2007; Paxton y col., 2007).

Estudios recientes demuestran que los patrones clínico y epidemiológico de la nosemosis están cambiando (Faucon, 2005; Higes y col., 2010c). La patología que se ha descrito siempre para las infecciones por *Nosema*, atribuidas a *N. apis* a falta de diagnóstico molecular, presenta una clara estacionalidad. La nosemosis se relacionaba con bajos niveles de infección durante el verano, un pequeño pico en otoño y una subida lenta durante el invierno que se agudizaba en primavera coincidiendo con el comienzo de la cría. Esta estacionalidad sigue observándose en colmenas como las alemanas, en las que *N. apis* todavía es más prevalente. Esto podría ser debido a la pérdida de capacidad de germinación de las esporas de *N. ceranae* a bajas temperaturas, lo que evitaría su proliferación en las colonias durante el invierno. De forma contraria, en las colmenas españolas en las que la mayoría de las infecciones son causadas por *N. ceranae*, en los últimos años los niveles de infección durante el verano han ido subiendo hasta desaparecer cualquier indicio de estacionalidad probablemente por su mayor adaptabilidad a las altas temperaturas (Martin-Hernandez y col., 2007; Gisder y col., 2010a; Bernal y col., 2011). Se ha postulado que la estacionalidad de la nosemosis puede estar relacionada con las precipitaciones y con el estrés debido a la manipulación de las colmenas. En ninguno de los dos casos ha podido demostrarse dicha relación, al menos en España (Martin-Hernandez y col., 2007; Bernal y col., 2011).

**c) Patología en la colonia.**

Un grupo social estrechamente conectado como es una colmena de abejas puede considerarse como un sistema de vida complejo, formado por organismos que funcionan como un todo (Higes y col., 2010c). Debido a esto, la patología causada por *N. ceranae* en las abejas

difiere de la causada en las colmenas. Habitualmente la colonia está capacitada para compensar las pérdidas provocadas por un patógeno letal para las abejas (Higes y col., 2008a).

En el caso de la nosemosis causada por *N. apis*, se sabe que ésta disminuye la longevidad de las abejas obreras y que también afecta a las abejas reina, comprometiendo la alimentación de las larvas que no llegan a alcanzar el estado de pupa (Hassanein, 1953; Fries, 1993). Sin embargo, *N. apis* ha alcanzado una situación de equilibrio con su hospedador en la que sus efectos en el total de la población son mínimos, posiblemente gracias a la disminución de la infección en el verano, estación durante la que se recupera la colonia. A pesar de que la colonización de *N. ceranae* ha sido un éxito, hecho que demuestra su presencia en la mayoría de los países europeos, ésta no ha logrado alcanzar la misma situación de equilibrio con su reciente hospedador (Martín-Hernández y col., 2007).

Higes y col. (2008a) describieron cuatro fases en la nosemosis causada por *N. ceranae* en las colmenas. En la primera fase, llamada "asintomática", y a pesar de que las abejas están infectadas, las colmenas no presentan ningún signo de enfermedad. En la segunda fase, la de "reemplazo", la abeja reina continua poniendo huevos durante todo el invierno. Se trata de un comportamiento inusual, al menos en España, región en la que se llevó a cabo el estudio. La tercera fase comenzaría en la siguiente primavera cuando las colonias crecen rápidamente y las abejas reina suelen realizar una puesta muy numerosa. Dado el aumento de la población durante esta fase, se la ha denominado de "falsa recuperación". Aunque en realidad, esta recuperación no se produce, pues a pesar de que la reina sigue poniendo huevos hasta el comienzo del otoño, en esa época comienza la fase de "despoblamiento" en la que se observa una repentina pérdida de abejas adultas y del vigor de las colmenas, alcanzando las puestas el número mínimo de huevos. A pesar de que las colmenas son muy activas en esta fase, la abeja reina muere en un periodo de dos meses (Higes y col., 2008a).

La descripción de estas fases ha permitido que, a pesar de que la nosemosis tipo C sea típicamente asintomática, se hayan podido identificar una serie de características clínicas relacionadas con ella, al menos en España (Higes y col., 2008a). En este caso, como ya se ha descrito anteriormente, el periodo de cría se alarga durante los meses fríos, se da una mayor proporción de prole en relación con las nodrizas en los meses cálidos y se observa una disminución en la producción de miel. En general, la colmena se debilita y merma el número de abejas adultas, hasta que se colapsa en un periodo máximo de dos años (Higes y col., 2010c).

Al estudiar la prevalencia de *N. ceranae* (proporción de abejas infectadas) y la intensidad de la infección (media de esporas por abeja) causada por la misma, Smart y Shephard (2012) establecieron una correlación positiva entre estas dos variables, y observaron cómo las abejas pecoreadoras eran las más afectadas por dicha infección en comparación con las demás abejas de la colonia.

Debido a la falta de estacionalidad en la infección producida por *N. ceranae* y basándose en el hecho de que ésta produce la muerte de las abejas en 8 días sin presentar

síntomas externos, Higes y col. (2007 y 2008c) propusieron la teoría de que las abejas pecoreadoras mueren repentinamente fuera de la colmena cuando salen a buscar comida, lo que provoca un despoblamiento gradual de las colmenas que no se puede compensar con la población emergente llegando al colapso de las mismas. Por ello se considera a *N. ceranae* como un patógeno a corto plazo para las abejas y a largo plazo para la colmena (Higes y col., 2010b).

Este cambio en el comportamiento de las abejas pecoreadoras podría explicarse por el hecho de que *N. ceranae* reduce el nivel de azúcares en la hemolinfa de las abejas que infecta. Se ha observado que en estas abejas los niveles de trealosa (glucosa-glucosa), el principal carbohidrato en la hemolinfa de los insectos, son más bajos que en las sanas, lo que podría relacionarse con el estrés energético impuesto por el parásito a su hospedador al utilizar los recursos de éste (Mayack y Naug, 2010; Aliferis y col., 2012). Estos resultados son secundados por otros experimentos, que mostraron una mayor expresión de los genes implicados en el metabolismo del azúcares y el transporte de trealosa en las abejas infectadas (Dussaubat y col., 2012). Así mismo, otros trabajos describieron un aumento del consumo de sirope por parte de las abejas, supuestamente para compensar esas pérdidas de azúcares (Mayack y Naug, 2009; Martín-Hernández y col., 2011). Una disminución en los niveles de trealosa podría llevar a una disminución en la autonomía de vuelo (se estima que las abejas infectadas pueden volar sólo dos tercios de la distancia que vuelan las sanas), un detrimento en la termorregulación y, por lo tanto, una menor capacidad para regresar a la colmena, especialmente en días fríos (Mayack y Naug, 2010; Martín-Hernández y col., 2011).

Por otra parte, Kralj y col. (2007) observaron que las abejas pecoreadoras modifican su comportamiento de vuelo no regresando a la colonia cuando ésta está infectada por *V. destructor*, lo que interpretan como un comportamiento adaptativo para expulsar a los patógenos de la colonia, comportamiento denominado "eliminación suicida del patógeno" y que podría ser otra posible explicación al despoblamiento de las colmenas (Kralj y col., 2007).

Con respecto a la colonia, un incremento del nivel de hambre podría derivar en un aumento de la trofalaxis lo que aumentaría a su vez la transmisión y diseminación de la infección (Martín-Hernández y col., 2011). Dussaubat y col. (2010) han comprobado como la infección causada por *Nosema* produce en las abejas un aumento significativo de la producción de etil oleato (EO), feromona que regula la maduración en el comportamiento de las abejas obreras inhibiendo la transición de las nodrizas encargadas del mantenimiento interno de las colmenas, que pasan a ser pecoreadoras, responsables de la búsqueda de alimento. El aumento de población de pecoreadoras podría ser una respuesta de la colonia para disminuir la carga de patógeno dentro de la colmena, por lo que la inhibición de ese paso produciría un retraso en el desarrollo de las nodrizas, permitiendo la diseminación del patógeno dentro de la colmena. Este comportamiento también podría derivarse de la necesidad de la colonia de elevar las tasas de pecoreo para compensar el estrés nutricional (Martín-Hernández y col., 2011).

La hormona juvenil (JH) en los insectos está relacionada con procesos como la metamorfosis, el desarrollo, la reproducción y el comportamiento de los mismos, así como en la determinación de castas, el vuelo, el estímulo de la migración, la regulación de la diapausa, la resistencia al estrés y el envejecimiento. Al medir los niveles de JH en la hemolinfa de abejas infectadas con *N. ceranae*, éstos resultaron ser mucho más altos que en las abejas control sin infectar (Ares y col., 2012).

Los experimentos referidos anteriormente se habían realizado con abejas obreras, sin embargo, también se estudió el impacto de la infección causada por *N. ceranae* en la fisiología de las abejas reina, observándose un aumento en los niveles de vitelogenina (indicador de fertilidad y longevidad), la capacidad antioxidante y la producción de feromonas mandibulares. Dicho impacto en la salud de la reina podría ser de gran importancia en la colmena, ya que ésta monopoliza la reproducción y regula la cohesión de la colonia a través de las feromonas que produce. Un cambio en la producción de hormonas explicaría esa precocidad en el reemplazo de la reina (Alaux y col., 2011).

#### **1.2.6.2. El síndrome de despoblamiento de las colmenas y sus posibles causas.**

El síndrome de despoblamiento de las colmenas (CDS, *Colony Depopulation Syndrome*) o pérdida de colonias como se denomina en Europa (COLOSS, 2009), también conocido como desorden del colapso de las colmenas de abejas (CCD, *Colony Collapse Disorder*) en América, consiste en la desaparición repentina de las abejas adultas. Aún no se ha encontrado una explicación para él, ya que los recursos para la supervivencia de las abejas son abundantes en las colmenas y no se encuentran apenas abejas muertas en los alrededores de las mismas. Las colmenas quedan por tanto pobladas solo con la reina y una pequeña población de obreras lo que se traduce en una falta de atención de las crías y un debilitamiento de las colmenas, muchas de las cuales se pierden sin el menor indicio de afección debido a una elevada mortalidad invernal sin síntomas de enfermedad. Consecuentemente, la producción de miel disminuye (Higes y col., 2009c; Bromenshenk y col., 2010). Se desconoce si el colapso es la fase final de una infección crónica debida a un parásito silencioso cuya infección no produce síntomas hasta unas horas antes de colapso total de la colmena (Higes y col., 2008a).

Además de la reciente aparición de *N. ceranae*, se han estudiado otras variables como posibles causas del síndrome de despoblamiento de las colmenas. Algunas de estas causas son la destrucción del hábitat y los cambios en el uso de las tierras destinadas a la agricultura (Williams, 2005; Naug, 2009; Morimoto y col., 2011), la exposición a pesticidas, la falta de alimento, o las infecciones por otros parásitos como la mosca *Apocephalus borealis* (Core y col., 2012) o el ácaro *Varroa destructor* (Garrido-Bailón y col., 2010) y patógenos como el virus de las celdas reales negras (BQCV *Black Queen Cell Virus*), el virus de las alas deformes (DWV *Deformed Wing Virus*), el virus de la cría (SBV *Sacbrood virus*), el virus de la parálisis crónica (CBPV *Chronic Bee Paralysis Virus*), el virus de la parálisis aguda (ABPV *Acute Bee Paralysis Virus*), el virus

Kashmir (KBV *Kashmir Bee Virus*) y el virus israelita de la parálisis aguda (IAPV *Israeli Acute Paralysis Virus*) (Antúñez y col., 2012).

El DWV y el IAPV se han propuesto como marcadores del síndrome de despoblamiento a partir de estudios de metagenómica, y el virus *Varroa Destructor-1* (VDV-1), descubierto mediante estudios de proteómica. Así mismo, otros estudios del transcriptoma realizados utilizando técnicas basadas en la expresión de genes, determinaron gran variedad de fragmentos de ARN que podrían ser marcadores del síndrome, aunque no lograron determinar si estos fragmentos pertenecían al virus o al hospedador. Sin embargo en ninguno de estos casos se ha demostrado relación directa alguna con el síndrome de despoblamiento de las colmenas e incluso algunos investigadores han concluido que éste no es una enfermedad específica sino que se debe a una mezcla de diferentes variables como patógenos, estrés fisiológico o intoxicaciones (Cox-Foster y col., 2007; Stokstad, 2007; Anderson y East, 2008; Bromenshenk y col., 2010; Garrido-Bailón y col., 2010; Dainat y col., 2012b; Pettis y col., 2012).

Basándose en estas conclusiones y utilizando espectrometría de masas, Bromenshenk y colaboradores en 2010 encontraron evidencias de la correlación entre los Virus Iridiscentes de Invertebrados (IIV), *Nosema* sp. y el CCD en Estados Unidos. Describieron como en todas las colmenas colapsadas o a punto de colapsar que estudiaron, se encontraban péptidos de *N. ceranae* junto con los de estos virus. Además observaron que cuando la población de abejas descendía, los valores de estos péptidos aumentaban y se mantenía en niveles altos a medida que disminuía la frecuencia de vuelo de las pecoreadoras y hasta el colapso total de la colmena, momento en el que las cargas de los distintos patógenos alcanzaba sus niveles máximos. Actualmente estos descubrimientos están siendo cuestionados debido a la metodología utilizada en los mismos (Knudsen y Chalkley, 2011; Tokarz y col., 2011).

Para corroborar sus resultados, Bromenshenk y colaboradores (2010) inocularon abejas en su laboratorio con IIV y *N. ceranae*. La patogenicidad resultó ser mayor en las abejas con infección mixta que en aquellas inoculadas con uno solo de los patógenos. Podría ser que la presencia o ausencia del IIV explicara por qué *N. ceranae* se relaciona solo en algunos casos con pérdidas en colonias. Aún no se sabe si el efecto de la interacción patogénica entre IIV y *N. ceranae* podría darse con otros virus. Tampoco se ha determinado si dicho efecto es sinérgico o aditivo, pero existen teorías que apuntan a que los daños producidos por *N. ceranae* en la célula hospedadora, bien por la extrusión del tubo polar o por su replicación en el interior de la misma, permiten una mejor entrada del virus y disminuyen la capacidad del hospedador de responder a la infección por éstos. En el caso del DWV (virus de las alas deformadas) se ha descrito una relación de antagonismo entre éste y la carga de esporas de *N. ceranae* (Costa y col., 2011).

En cuanto a los pesticidas, comúnmente se ha utilizado un amplio espectro para el control de plagas de cereales, pero debido a su efecto tóxico sobre otros organismos, incluido el hombre, su uso se ha compatibilizado con otras estrategias basadas en el control biológico que incluye su uso a dosis subletales junto a patógenos microbianos, en la mayoría de los casos



hongos. Los hongos entomopatogénicos utilizados junto a insecticidas químicos, aumentan su letalidad al actuar de manera sinérgica (IPM o *Intengrated Pest Management*). Las abejas están expuestas a estos pesticidas a través del polen y el néctar que consumen y que se perfila como una fuente de estas sustancias tóxicas (Higes y col., 2010b).

Los neonicotinoides son una clase de pesticidas sistémicos relativamente nueva (Pettis y col., 2012). El imidacloprida es uno de los más efectivos y más comúnmente utilizados para tratar una amplia variedad de plagas de insectos en cereales. Se sospechó que éste insecticida podría estar causando pérdidas de abejas en Francia, ya que se encontraron residuos del mismo en un alto porcentaje de colmenas. Sin embargo, los niveles de exposición de las mismas eran subletales, y no se observó ningún efecto sobre su mortalidad (Alaux y col., 2010). El hecho de que también se relacionara a *N. ceranae* con dichas pérdidas podría indicar que existe una interacción sinérgica entre ambos agentes que está causando la muerte de las abejas.

Para intentar demostrar esta interacción, en 2010 Alaux y colaboradores estudiaron la interacción entre el imidacloprida y *N. ceranae* en abejas *A. mellifera*, tanto a nivel individual como en la colonia. Observaron cómo la mortalidad de los grupos expuestos al imidacloprida aumentaba a medida que aumentaba la concentración de éste, y cómo este aumento era mucho mayor en aquellos grupos que, a la vez, estaban infectados con *N. ceranae*, mostrando un efecto aditivo. En otro experimento se estudiaron los efectos del thiacloprid (también neonicotinoide) y el fipronil (un fenilpirazol), en dosis subletales (Vidau y col., 2011). Ambos aumentaron la mortalidad de las abejas previamente infectadas con *N. ceranae*, produciendo síntomas de envenenamiento mientras que no tuvieron efecto ninguno en la mortalidad o el comportamiento de las abejas no infectadas. Por tanto, la toxicidad de los insecticidas aumentaría en presencia de *N. ceranae* por lo que la LD<sub>50</sub> de éstos podría estar siendo subestimada en abejas infectadas.

En el estudio de Alaux y colaboradores (2010), el consumo de sacarosa, tomado como medida de estrés energético, presentó un patrón similar al de la mortalidad, dado que los grupos infectados con *N. ceranae* (parásito que altera el almacenamiento de nutrientes y el comportamiento alimenticio en el hospedador), incrementaron su consumo de la misma, lo que se relacionó además con exposiciones mayores de imidacloprida, posiblemente debido a la mayor ingesta de alimentos contaminados con ésta, pasando de los niveles comúnmente subletales a niveles letales. Estos resultados coincidieron con los obtenidos por Vidau y col. en 2011.

Cabe destacar un posible efecto inhibitorio del imidacloprida sobre la germinación de las esporas del microsporidio ya que el recuento de las mismas fue menor en los grupos expuestos al pesticida (Alaux y col., 2010). En cuanto al fipronil y al triacloprid, estos presentaron efectos antagónicos en la producción de esporas. Mientras que con el primero se observó una reducción de la misma (posiblemente debida al efecto del insecticida sobre el epitelio intestinal de las abejas), con el segundo ésta aumentó (Vidau y col., 2011). Estos resultados tan dispares

parecen sugerir que el uso de estos pesticidas no está relacionado con una mayor virulencia por parte de *N. ceranae*.

Con respecto a la imidacloprida, no se encontró ningún efecto sobre la actividad enzimática de la fenoloxidasa (implicada en la respuesta inmune de los insectos) ni en el recuento de hemocitos (medida indirecta de la inmunocompetencia celular basal). Sin embargo, en cuanto a la inmunidad en la colonia, se observó que en los grupos afectados por los dos agentes (*N. ceranae* e imidacloprida), disminuía la actividad específica de la glucosa oxidasa, enzima que cataliza la  $\beta$ -D-glucosa produciendo entre otros peróxido de hidrógeno, de propiedades antisépticas y utilizado por las abejas para la prevención de enfermedades en la colmena (Alaux y col., 2010).

Los anteriores estudios (Alaux y col., 2010; Vidau y col., 2011) trataban a las abejas de manera puntual e individualmente. Una exposición crónica a dosis subletales de pesticidas de toda la colonia supondría un modelo científicamente más robusto, ya que permitiría extrapolar dichas interacciones a la realidad (Pettis y col., 2012). De hecho, al llevar a cabo este estudio se observó un aumento significativo de la producción de esporas de *Nosema* de manera individual en las abejas de las colonias tratadas, y sin embargo, al estudiar la colonia, no se observó dicho incremento a lo largo del tiempo. Esto podría atribuirse a la farmacocinética del pesticida dentro de la colonia (poco conocida hasta ahora) o a la gran variabilidad entre los recuentos de esporas de *Nosema* entre colonias, poniendo de manifiesto las deficiencias de este método para determinar las infecciones causadas por el parásito (Pettis y col., 2012).

Por otro lado, al estudiar los efectos potenciales de los pesticidas durante el desarrollo de las larvas, se observó una mayor susceptibilidad a la infección por *N. ceranae* en las abejas expuestas a elevados niveles de residuos de pesticidas durante su desarrollo, y además, un desarrollo de dicha infección a edades más tempranas (Wu y col., 2012).

Los cuatro estudios descritos muestran una cierta sinergia entre los pesticidas y *Nosema*. A la vista de estos resultados, se podría inferir que, en las condiciones actuales, una prevalencia en aumento de *N. ceranae* combinada con una exposición continua a tóxicos podría contribuir al despoblamiento de las colmenas (Vidau y col., 2011; Pettis y col., 2012; Wu y col., 2012).

Todos los ensayos explicados hasta ahora fueron desarrollados en condiciones de laboratorio; por otra parte, también se han realizado estudios epidemiológicos en condiciones de campo utilizando colmenares españoles (Bernal y col., 2010; Garrido-Bailón y col., 2010; Higes y col., 2010b; Bernal y col., 2011). En el polen almacenado de las colmenas estudiadas se detectaron los pesticidas fipronil e imidacloprida aunque en menor abundancia que otros insecticidas y acaricidas que se utilizan normalmente para el control de *Varroa destructor* (fluvalinato y chlofenvinphos). Hay que resaltar que la frecuencia de los mismos resultó muy baja y no se demostró una relación significativa entre la presencia de éstos y los síntomas de despoblamiento. A esto hay que añadir que el fipronil sólo se utiliza en España desde el año 2004 para el tratamiento de semillas de girasol, y que esta utilización se restringe a unas zonas muy

determinadas de la península. Dado que los síntomas de despoblamiento se han observado también en otras zonas y con anterioridad a ese año no parece que exista una relación directa con el problema de la pérdida de colonias. El uso de la imidacloprida a su vez está autorizado para tratar maíz, árboles frutales y otros cultivos vegetales (Higes y col., 2010b).

Podemos concluir que, aunque los virus o los pesticidas no sean los responsables directos del despoblamiento de las colonias de abejas, si pueden contribuir al debilitamiento de las mismas y hacerlas más sensibles a cualquier otro factor, como por ejemplo la infección por patógenos (Bernal y col., 2011).

### 1.2.7. INTERACCIÓN PARÁSITO-HOSPEDADOR: RESPUESTA INMUNOLÓGICA.

Los insectos poseen un robusto sistema inmune que les defiende del ataque de distintos patógenos bacterianos y microbianos. Este sistema inmune supone una segunda línea de defensa contra agentes infecciosos después de las barreras físicas que suponen su exoesqueleto quitinizado y la membrana peritrófica que reviste su tracto digestivo (Antúnez y col., 2009).

En el caso de los insectos, se han utilizado numerosos modelos de laboratorio para estudiar la respuesta inmune inducida en ellos por los microsporidios en ellos: *Drosophila melanogaster*, *Aedes aegypti*, *Apis mellifera* y miembros de las familias *Orthoptera* y *Lepidoptera*. Esto ha hecho que la diversidad de esas respuestas sea en algunos casos contradictoria.

En general, la inmunidad innata de los insectos se divide en dos grandes categorías: la celular y la humoral. La inmunidad celular supone procesos como la fagocitosis, la nodulación y la encapsulación, en presencia de la enzima glucosa deshidrogenasa (GLD). A menudo, estos procesos van acompañados de una melanización catalizada por la enzima (profenol-) fenoloxidasas (PO). También es importante la lisozima (LYS) utilizada por los insectos contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. A su vez, la inmunidad humoral implica la síntesis de bacterias de péptidos antimicrobianos en respuesta a la infección por bacterias, hongos o parásitos (Antúnez y col., 2009).

Por ejemplo, se ha observado la inducción de la inmunidad celular en orugas (*Lepidoptera*), en grillos y langostas (*Orthoptera*) y en *Drosophila*. Dependiendo del modelo estudiado, esta respuesta puede producir un incremento del número total de hemocitos, fagocitosis, encapsulamiento de los tejidos infectados, nodulación de parásitos melanizados y/o melanización asociada a una esporogonia anormal de los parásitos.

Se sabe muy poco de la regulación molecular de la inmunidad de los insectos frente a los microsporidios. Existen estudios de transcriptómica y proteómica en distintos modelos de insecto que describen algunos elementos (Texier y col., 2010). Sin embargo estas respuestas de

defensa no previenen la progresión de las infecciones, que pueden o bien ser crónicas o causar la muerte del hospedador. Existen muchos datos que sostienen la teoría de que estos parásitos poseen mecanismos de supervivencia y pueden modular o incluso suprimir la inmunidad del hospedador.

Otro tipo de inmunidad que se puede encontrar en los insectos sociales, y particularmente en las abejas, es la Inmunidad Social, que consiste en la colaboración entre los distintos individuos del grupo para prevenir la infección y el desarrollo de enfermedades. Al analizar el genoma de las abejas se observó que estas poseen sólo un tercio de los genes relacionados con la respuesta inmune conocidos en los insectos solitarios, lo que podría explicarse por una inmunidad social menos costosa y más efectiva que la individual. En el caso de las abejas esta inmunidad incluye el comportamiento higiénico que consiste en la capacidad de detectar y eliminar a la prole enferma de la colmena. Así mismo, existe un comportamiento llamado antiséptico llevado a cabo mediante la secreción de sustancias antisépticas en los alimentos de las larvas y en la miel (Alaux y col., 2010).

En general, e independientemente de cuál sea el hospedador, la resolución de la infección depende de la eficiencia de la inmunidad inducida por los microsporidios, que no depende sólo de las características del propio hospedador sino también de la capacidad de evasión e inmunomodulación de los parásitos.

Además de las respuestas de insectos asociadas a la inmunidad celular previamente citadas, se ha descrito para las abejas (*A. mellifera*) una batería de péptidos antibacterianos involucrados en la respuesta humoral. Esta batería incluye la apidaecina, la abaecina, la hymenoptaecina y la defensina. Por otro lado, también se ha descrito la vitelogenina (Vg), un péptido específico de las hembras de abeja que ayuda a integrar la organización social de la colmena a través de la especialización de las obreras y las pecoreadoras. La expresión de este péptido también se ha asociado a cierta resistencia al estrés oxidativo (Antúnez y col., 2009; Chaimanee y col., 2012).

Antúnez y colaboradores (2009) evaluaron los efectos de la infección por *N. apis* y *N. ceranae* en la respuesta inmune de las abejas de la miel mediante el estudio de la expresión génica de algunos de estos péptidos, así como de algunas de las enzimas relacionadas con la inmunidad. Observaron cómo *N. apis* activa rápidamente (desde el cuarto día post-infección) los mecanismos de defensa del sistema inmune, mientras que la infección por *N. ceranae* parece suprimir dicha respuesta inmune reduciendo la transcripción de los genes estudiados. Una disminución de la expresión de vitelogenina después de la infección por *N. ceranae* podría explicar la reducción del periodo de vida observado en las abejas obreras infectadas por este parásito, dado el papel descrito para este péptido en la resistencia al estrés oxidativo y la ralentización de la senescencia. En un experimento similar, también se observó una disminución en la expresión de los genes que codifican para esos péptidos entre el tercer y sexto días post-infección con *N. ceranae*, aunque esta expresión no difería con la de los controles doce días

después de las inoculaciones, y los niveles de vitelogenina tampoco diferían significativamente entre los grupos (Chaimanee y col., 2012).

Un estudio de transcriptómica sobre la respuesta inmune a nivel intestinal de abejas infectadas con *N. ceranae* no detecta la activación de genes propios del sistema inmune innato, lo que podría indicar cierta supresión de dicho sistema por parte del parásito. Por el contrario, el mismo estudio indica una activación de los genes relacionados con el estrés oxidativo y la degeneración de tejidos. Este tipo de respuesta inmune inmediata del intestino a través de la producción de especies de oxígeno reactivas (ROS) ya se ha descrito en mamíferos expuestos a infecciones bacterianas (Dussaubat y col., 2012).

Estos estudios confirman el impacto negativo de *N. ceranae* descrito previamente en las colmenas de abejas (Higes y col., 2007; Paxton y col., 2007; Higes y col., 2008a; Higes y col., 2009c; Dussaubat y col., 2012), siendo este parásito más prevalente y de mayor virulencia que *N. apis*. A la vista de estos resultados, dicha virulencia no se debería exclusivamente al impacto directo del parásito sobre las células del epitelio gastrointestinal, sino también a una cierta supresión del sistema inmune que puede favorecer no solo acción parasitaria sino la reactivación de otros patógenos latentes.

En un estudio distinto se observó el efecto contrario, aumentando la expresión del gen de la vitelogenina en correlación positiva con la carga de esporas de *N. ceranae* (Dainat y col., 2012a). Sin embargo, al estudiar en otro trabajo la regulación de este gen a lo largo de un año (Dainat y col., 2012b), los autores observaron como la expresión de vitelogenina se mantenía estable desde la primavera al otoño y aumentaba en invierno sólo en aquellas colmenas que sobrevivieron al mismo, aunque no mencionan si dichas colmenas estaban o no infectadas con *N. ceranae*.

#### **1.2.8. MÉTODOS DE DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE MICROSPORIDIOS.**

Dado que los microsporidios producen esporas como forma de resistencia y de diseminación, existe un gran número de métodos para el diagnóstico de las microsporidiosis que permiten la recuperación de dichas esporas así como su identificación, y que en general se utilizan de forma combinada.

Las esporas de microsporidio pueden visualizarse con el microscopio óptico, pero su pequeño tamaño hace necesario el uso de tinciones específicas que permitan la observación de ciertas características como su morfología, la presencia de una vacuola refringente o del cinturón (tubo polar teñido).

A partir de las características morfológicas de las esporas, no siempre es posible realizar una identificación específica, sobre todo en el caso de especies emparentadas. Por esa

razón, en algunas ocasiones se requiere un estudio de las características ultraestructurales de las mismas a través de la técnica de microscopía electrónica de transmisión (MET), que permite la observación de, entre otros, el tubo polar. Se trata de una estructura única y característica de los microsporidios (identificación de *Phylum*) que además permite la identificación de especie en función del número de vueltas en las que está enrollado dentro de la espora (García, 2002).

Muchas veces las diferencias entre especies aparecen sólo en algunas fases del ciclo, por lo que pueden no estar presentes en la muestra estudiada. Debido a esto, los laboratorios especializados han desarrollado técnicas que, además de aumentar la sensibilidad y especificidad, requieren menos tiempo como las técnicas inmunológicas y las de biología molecular (Ghosh y Weiss, 2009).

El cultivo celular ha contribuido al aislamiento y la identificación de microsporidios, pero no se utiliza como método de rutina, ya que resulta poco práctico por ser laborioso y muy susceptible a las contaminaciones, además de requerir una importante inversión en tiempo, infraestructuras y personal cualificado (Weber y col., 1999; Ghosh y Weiss, 2009).

El tipo de muestras clínicas que se procese para el diagnóstico de las microsporidiosis dependerá de la especie de parásito. Generalmente se procesan muestras de heces o aspirado duodenal. En los casos en los que la infección se haya diseminado, se recomienda también analizar la orina, así como otros fluidos corporales (esputos, bilis, lavado broncoalveolar, secreción nasal o líquido cefalorraquídeo) o muestras titulares de tipo intestinal, muscular, hepático, extensiones del tejido conjuntivo, raspado corneal, etc. (Weber y col., 1994; García, 2002).

#### **1.2.8.1. Microscopía óptica.**

La microscopía óptica permite el diagnóstico de los microsporidios de manera rápida y sensible. No obstante, aunque las características morfológicas pueden orientar el diagnóstico de las especies involucradas, debido al pequeño tamaño que presentan las esporas de estos organismos éstos no se pueden identificar a nivel de género ni especie por este método. Además también se requiere de personal experimentado para una correcta interpretación. Estos métodos no permiten identificar fácilmente el tubo polar. En éste caso el diagnóstico depende más bien de la detección de la pared de la espora que es birrefringente y que presenta ciertas características tintoriales (Ghosh y Weiss, 2009).

La tinción histológica de rutina, Hematoxilina-Eosina, realizada sobre secciones de tejido fijadas en formalina o parafinadas, no tiñe de modo predecible las esporas de microsporidios, las cuales se observan en ocasiones como cuerpos dorados refringentes. Por esta razón sólo patólogos muy experimentados son capaces de identificar microsporidios de manera concluyente utilizando esta técnica (García, 2002).

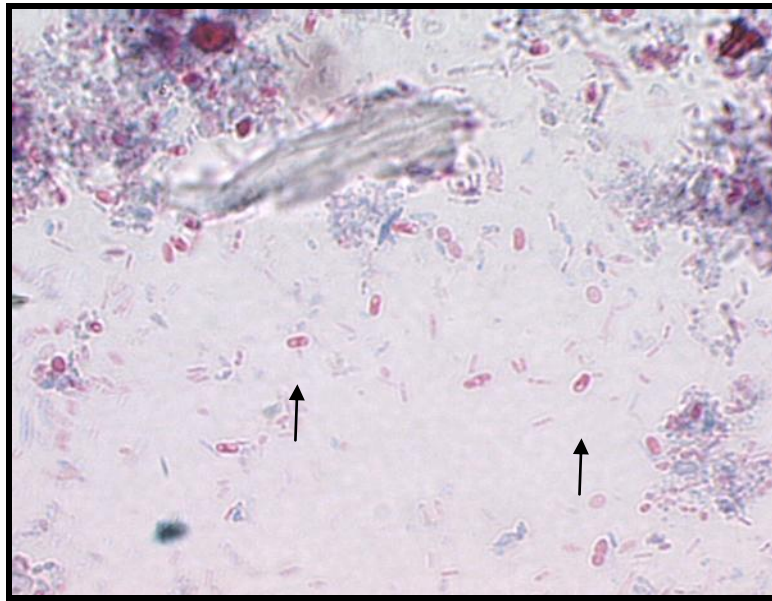
Para el diagnóstico de microsporidiosis también se puede utilizar la tinción de Giemsa, con la que las esporas aparecen teñidas de azul claro. Sin embargo, esta tinción sólo se recomienda para muestras de fluidos corporales o biopsias intestinales en las que la identificación de las esporas es más fácil debido a que se presentan más limpias que por ejemplo las muestras fecales, con artefactos que pueden dificultar dicha identificación (García, 2002).

Para el diagnóstico de las microsporidiosis en muestras fecales el Tricrómico Modificado (Weber y col., 1992) constituye una buena opción. Debido al escaso poder de penetración de los colorantes a través de la pared de la espora, esta tinción contiene una mayor concentración del reactivo cromotropo que el Tricrómico convencional, y además el tiempo de tinción es mayor. Esta tinción permite observar la pared de la espora teñida de un rosa característico mientras que el interior se mantiene incoloro por la presencia de la vacuola parasitaria refringente o en algunos casos, con una mancha horizontal o diagonal que se corresponde con el tubo polar (Figura 1.5.). Estas características, junto con la morfología y el tamaño de las esporas, permiten distinguirlas de otros organismos como bacterias y levaduras, así como de los artefactos que también pueden aparecer teñidos de rosa. De todos modos, es recomendable la utilización de un control positivo para validar los resultados.

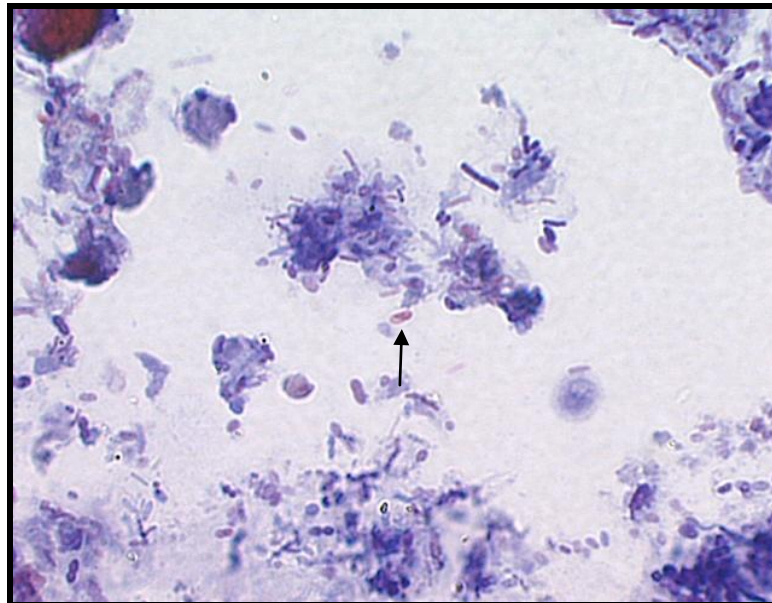
Actualmente existen varias técnicas de tinción disponibles para el diagnóstico de las microsporidiosis, que utilizan distintos colorantes de contraste como el *Fast Green* (Weber y col., 1992) o el Azul de Anilina en la tinción *Trichrome-blue* (Ryan y col., 1993). Además, se han propuesto modificaciones en la temperatura y en el tiempo de tinción que mejorarían la detección de las esporas tiñéndolas más intensamente y reduciendo el ruido de fondo (Didier y col., 1995; Weiss y Vossbrinck, 1999) así como su uso en combinación con la tinción de Gram o la de plata de *Warthin-Starry* (Ghosh y Weiss, 2009).

Las tinciones de Gram se utilizan frecuentemente para detectar microsporidiosis (que presentan una pared Gram-positiva) en muestras fecales y de tejidos, ya que dan resultados fiables con esporas de todas las especies de éstos parásitos. Con la tinción de Gram se resalta la birrefringencia que presentan las esporas presentes en secciones de tejidos parafinados, la cual se debe a la presencia de quitina en la endospora y permite diferenciarlas de lisosomas, gránulos neuroendocrinos o gotas de mucina. Además, con las tinciones de Gram las esporas maduras se tiñen de violeta a púrpura y se pueden distinguir de las inmaduras, que adquieren un color rojo. En algunos casos, además de la pared de la espora, permiten la observación de la banda horizontal o cinturón que se corresponde con el tubo polar (García, 2002).

Por otra parte se ha desarrollado la tinción del Gram-Cromotropo (Moura y col., 1997) que reduce el tiempo tinción con este colorante a sólo 5 minutos. Con ella, las esporas de microsporidiosis aparecen de color violeta intenso con gránulos Gram-positivos, lo que permite una observación más fácil (Figura 1.6.). Así mismo, otros autores han descrito la tinción tricrómica *Acid-fast*, que tiñe simultáneamente esporas de microsporidiosis y ooquistes de *Cryptosporidium* sp. (Ignatius y col., 1997).



**Figura 1.5.** Muestra fecal con esporas de *Encephalitozoon intestinalis* teñidas con Tricrómico Modificado. Cedida por el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad San Pablo-CEU.

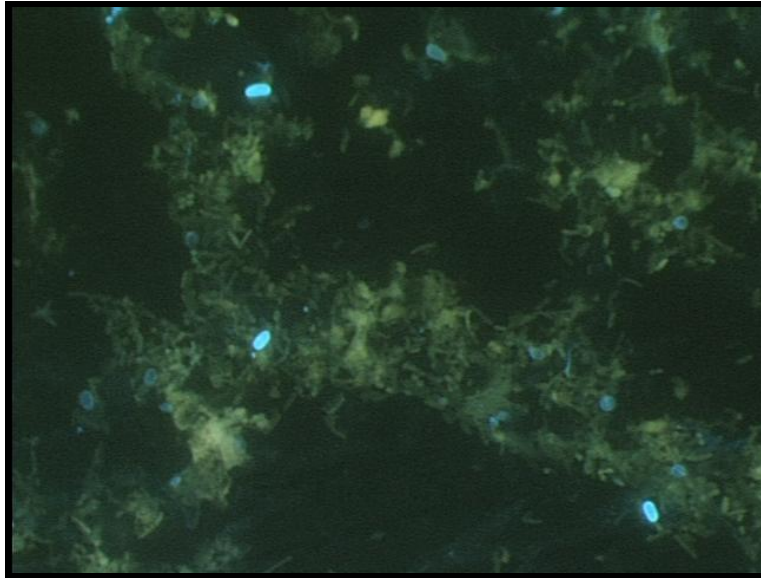


**Figura 1.6.** Muestra fecal con esporas de *Encephalitozoon intestinalis* teñida con Gram-Cromotrope. Cedida por el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad San Pablo-CEU.

Existe un amplio número de agentes quimioluminiscentes (*Calcofluor Whitw*, *Univitex 2B*, *Fungifluor*) que pueden utilizarse para la detección de esporas de microsporidios, aunque su uso requiere el empleo de un microscopio de fluorescencia. Estos agentes presentan afinidad por la quitina de la pared de la espora que, dependiendo del agente o de la longitud de onda



utilizados, emite una fluorescencia característica. Utilizando Calcoflúor las esporas aparecen como halos azul pálido o turquesa cuando se observan a una longitud de onda de 455 nm (Figura 1.7.). Este tipo de tinción puede utilizarse para detectar e identificar las esporas de microsporidios con una gran sensibilidad en diversos tipos de muestras, aunque no es recomendable para las fecales, ya que al no ser específica, algunos hongos y otros artefactos que puedan estar presentes en las heces también pueden emitir fluorescencia.



**Figura 1.7.** Muestra con esporas de *Encephalitozoon intestinalis* teñida con Calcoflúor. Cedida por el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad San Pablo-CEU.

Muchos laboratorios utilizan a la vez las tinciones de Tricrómico Modificado y de Calcoflúor. La sensibilidad de ambas técnicas es relativamente buena, y al utilizarlas conjuntamente, cuando la carga parasitaria es baja, las esporas que pueden pasar inadvertidas en una tinción de Tricrómico Modificado pueden observarse al teñirlas con agentes quimioluminiscentes (Didier y col., 1995; Ignatius y col., 1997; García, 2002).

Las esporas de microsporidios también pueden observarse utilizando la tinción *Periodic acid-Schiff* (PAS), ya que poseen una pequeña estructura posterior PAS-positiva. Así mismo, la pared de la espora puede teñirse con tinciones de plata, pero en este caso la estructura interna (el tubo polar) no se observa tan fácilmente, haciendo que las esporas parezcan de mayor tamaño del que realmente son. Así mismo, también se han utilizado el Azul de Toluidina o el Azul de Metileno para teñir secciones ultrafinas, y se han obtenido resultados satisfactorios (García, 2002).

### 1.2.8.2. Microscopía electrónica.

La observación de tejidos mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) se considera una de las mejores opciones para el diagnóstico de microsporidios, ya que permite ver los distintos estados de desarrollo necesarios para la identificación de la especie (Didier y col., 1995; García, 2002; Ghosh y Weiss, 2009). Sin embargo, en las muestras de fluidos corporales o heces sólo pueden verse las esporas y, además, con éstas últimas la sensibilidad disminuye debido a la presencia de bacterias y artefactos (Weber y col., 1994; García, 2002). A pesar de que se considera el “patrón de oro” para el diagnóstico y la identificación, en casos en los que existan especies morfológicamente idénticas como *E. hellem* y *E. cuniculi*, se requieren también pruebas inmunológicas o moleculares para la identificación de especie (Didier y col., 1995; García, 2002). No es una técnica asequible para muchos laboratorios debido a su elevado coste y a la necesidad de analistas experimentados en el diagnóstico, a lo que hay que añadir la inversión en tiempo para la preparación de la muestra y la necesidad de una alta carga parasitaria (Curry, 2003). La sensibilidad de esta técnica también se ve disminuida debido a la pequeña cantidad de tejido que se estudia cada vez y a la falta de amplificación de la señal, lo que sí se consigue con otras técnicas como las inmunológicas o las moleculares (Ghosh y Weiss, 2009).

De todos modos, la MET sigue siendo considerada la mejor herramienta para la clasificación de los microsporidios, ya que la identificación de sus géneros se basa en características ultraestructurales como el número de vueltas del tubo polar, los estados proliferativos de desarrollo y el tipo de división celular. Actualmente, esta técnica se utiliza en estudios taxonómicos y para la descripción de nuevas especies (Cali y Takvorian, 1999).

### 1.2.8.3. Técnicas inmunológicas.

En los últimos años también se han desarrollado métodos inmunológicos para la identificación de microsporidios, basados tanto en la detección de antígenos como en la detección de anticuerpos en suero.

Las técnicas utilizadas para la detección de antígenos suelen ser la inmunofluorescencia (IF), el ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA) o el *inmunoblot* (*Western blot*, *Dot Blot*, etc...). La IF puede utilizarse *in situ* sobre muestras fijadas pero requiere el uso de un microscopio de fluorescencia. En cambio, con el *inmunoblot* o el ELISA se examina un extracto antigénico de la muestra (Ghosh y Weiss, 2009).

En todas estas técnicas se utilizan anticuerpos poli y/o monoclonales de origen animal, los cuales reconocen antígenos específicos del género o de la especie de los patógenos, permitiendo distinguir organismos de similar morfología pero de distinta especie.

Los anticuerpos policlonales pueden reconocer varios epítomos de una estructura y, al aislarse del suero de un animal inmunizado, normalmente están presentes otros anticuerpos no específicos que pueden aumentar el ruido de fondo. Este hecho hace que deban utilizarse con cautela para el diagnóstico de rutina. Hay que destacar que a pesar de que se han observado reacciones cruzadas de los sueros policlonales con bacterias y hongos, éstos pueden distinguirse fácilmente de las esporas de microsporidios debido a sus características morfológicas y a su tamaño (Niederkorn y col., 1980; Weiss y col., 1992; Zierdt y col., 1993; Aldras y col., 1994; Visvesvara y col., 1994; Didier y col., 1995; Ombrouck y col., 1995; Visvesvara y col., 1995). Se ha descrito que la inmunofluorescencia indirecta (IFI), utilizando sueros policlonales, presenta menor sensibilidad que otras técnicas como la tinción del Cromotropo o con agentes quimiofluorescentes en muestras de heces, orina y fluido duodenal (Didier y col., 1995). Podría considerarse por tanto una buena técnica para la diferenciación de la especie una vez se ha diagnosticado la microsporidiosis mediante las técnicas de tinción citadas anteriormente.

En el desarrollo de anticuerpos policlonales frente a microsporidios, el mayor esfuerzo se ha realizado sobre aquellas especies capaces de producir patología en el hombre, y se han obtenido sueros inmunes frente a *Nosema corneum* (Aldras y col., 1994) y principalmente frente a *Encephalitozoon hellem* (Schwartz y col., 1992; Weber y col., 1993; Aldras y col., 1994); *E. cuniculi* (De Groote y col., 1995; Delbac y col., 1998; Sobottka y col., 2001); *E. intestinalis* (Visvesvara y col., 1994; Visvesvara y col., 1995; Sodré y col., 1997; Bornay-Llinares y col., 1998; Moura y col., 1999; Sobottka y col., 2001) y *Enterocitoozoon bienewisi* (Didier y col., 1991; Visvesvara y col., 1991; Kucerova y col., 2004; Sheoran y col., 2005a). También se han obtenido anticuerpos policlonales frente a *Glugea atherinae* (Delbac y col., 1998), un microsporidio parásito de peces.

Con respecto a los anticuerpos monoclonales también se han desarrollado (Tabla 1.1.) tanto anticuerpos genéricos anti *Phylum Microsporidia* (Lujan y col., 1998) como anti género *Encephalitozoon* (Enriquez y col., 1997) así como para la detección específica de *E. hellem* (Aldras y col., 1994; Croppo y col., 1994; Visvesvara y col., 1994; Enriquez y col., 1997; Croppo y col., 1998; Enriquez y col., 1998; Lujan y col., 1998; Mo y Drancourt, 2002); *E. cuniculi* (Aldras y col., 1994; Keohane y col., 1994; De Groote y col., 1995; Croppo y col., 1997; Delbac y col., 1998; Enriquez y col., 1998; Bohne y col., 2000; Franzen y col., 2004; Mo y Drancourt, 2004; Sak y col., 2006; Furuya y col., 2008a); *E. intestinalis* (Visvesvara y col., 1995; Beckers y col., 1996; Bornay-Llinares y col., 1998; del Águila y col., 1998; Enriquez y col., 1998; Lujan y col., 1998; Achbarou y col., 1999; Prigneau y col., 2000; Hayman y col., 2001; Thellier y col., 2001; Bouladoux y col., 2003; Reetz y col., 2009); *E. bienewisi* (Weiss y col., 1992; Zierdt y col., 1993; Accoceberry y col., 1999; Achbarou y col., 1999; Sorel y col., 2003; Sheoran y col., 2005a; Sheoran y col., 2005b; Zhang y col., 2005; Reetz y col., 2009), y también frente a otros microsporidios parásitos de peces, como *Glugea americanus* (Keohane y col., 1994; Keohane y col., 1996) y *Glugea atherinae* (Pomport-Castillon y col., 1997) o de insectos como *Nosema locustae* (Knoblett y Youssef, 1996; Keohane y col., 2001) o *N. bombycis* (Shamim y col., 1997; Li y col., 2007; Zhang y col., 2007; Li y col., 2009).

**Tabla 1.1.** Anticuerpos monoclonales múridos obtenidos para la detección de microsporidios. Obtenido y ampliado de Izquierdo, 2007.

Especie	Referencia	Anticuerpo	Isotipo	Reconocimiento celular	Reconocimiento antigénico (kDa)	Aplicación en el estudio
<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	Achbarou y col., 1999	M <sub>2</sub> 3B <sub>8</sub> 2H <sub>2</sub>	IgM	Exoespora	ND	IFI
		M <sub>4</sub> 6E <sub>5</sub> 2D <sub>9</sub>	IgG	Exoespora	ND	IFI
	Accoceberry y col., 1999, 2001	6E52D9	IgG <sub>2a</sub>	Exoespora	ND	IFI, columna de inmunoafinidad
		3B82H2	IgM	Exoespora/Endoespora	ND	
	Sheoran y col., 2005b	1D4,3E9,2B2,2G4	IgM	Exoespora	Ausencia de reactividad <sup>1</sup>	IFI, Western blot
		2E9,4B2,4C9,4C3	IgM	Exoespora	Ausencia de reactividad <sup>1</sup>	IFI, Western blot
	Zhang y col., 2005	6B6, 8D10, 7G2	IgG <sub>2a</sub>	Exoesp. (AcMc 7G2)	40 (AcMc 7G2)	IFI, Western blot
		7H2, 1B7	IgG <sub>2a</sub>	Exoespora	40 (AcMc 7H2)	IFI, Western blot
		9G5, 12G8	IgG <sub>2b</sub>	Exoesp. (AcMc 12G8)	40 (AcMc 12G8)	IFI, Western blot
		8E2	IgG <sub>1</sub>	Exoespora	ND	IFI
		8E7,1C3,7H3,9A3,9A7	IgM	Exoespora	ND	IFI
		9H8,8A11,11A3,11B4	IgM	Exoespora	ND	IFI
		5F2,6A7,4F9,1G8,6G7	IgM	Exoespora	ND	IFI
		5H10	IgM	Exoespora	ND	IFI
		6B10, 3D10, 4A4	IgM	Endoespora	ND	IFI
<i>Encephalitozoon intestinalis</i>	Beckers y col., 1996	Si13	IgG <sub>3</sub>	Exoespora	130	IFI, Western blot
		Si91	IgG <sub>1</sub>	Tubo polar	60, 120	IFI, Western blot
	Enriquez y col., 1997b, 1998	3B6	IgG <sub>2b</sub>	Exoespora	53, 102, 117	IFI, Western blot
	Luján y col., 1998	4A12	IgM	Tubo polar	55	IFI, Western blot, Dot blot
		6F4	IgG <sub>1</sub>	Exoespora	40, 50, 60	IFI, Western blot, Dot blot
		19F10, 11B2, 1E4	IgG <sub>2a</sub>	Exoespora	40, 50, 60	IFI, Western blot, Dot blot
		13G8	IgM	Exoespora	Ausencia de reactividad <sup>1</sup>	IFI, Western blot, Dot blot
		4D1, 19C12	IgG <sub>3</sub>	Exoespora	Ausencia de reactividad <sup>1</sup>	IFI, Western blot, Dot blot
		14C6	IgG <sub>1</sub>	Exoespora	40, 50, 60	IFI, Western blot, Dot blot
		15C7	IgM	Exoespora	23	IFI, Western blot, Dot blot
		4H7, 7D8	IgG <sub>3</sub>	Exoespora	Ausencia de reactividad <sup>1</sup>	IFI, Western blot, Dot blot
		1D9	IgG <sub>2a</sub>	Exoespora	55	IFI, Western blot, Dot blot
		7G7	IgG <sub>1</sub>	Exoespora	23	IFI, Western blot, Dot blot
		21B10, 2D5	IgG <sub>1</sub>	Exoespora	Ausencia de reactividad <sup>1</sup>	IFI, Western blot, Dot blot
		3A6	IgG <sub>1</sub>	Exoespora	40, 50, 60	IFI, Western blot, Dot blot
	Achbarou y col., 1999	M <sub>1</sub> 6C <sub>1</sub> 2C <sub>11</sub>	IgG	Exoespora	125	IFI, Western blot
		M <sub>3</sub> 3D <sub>9</sub> , M <sub>3</sub> 3D <sub>9</sub> F <sub>7</sub>	ND	Exoespora	125	IFI, Western blot
		M <sub>3</sub> 2E <sub>3</sub>	ND	Endoespora	18-110	IFI, Western blot
	Prigneau y col., 2000	M <sub>3</sub> 3D <sub>9</sub>	IgG	Exoespora	125	IFI, Western blot
		M <sub>3</sub> 2E <sub>3</sub>	IgG	Endoespora	18-50, 55-60	IFI, Western blot
		M <sub>3</sub> 3C <sub>8</sub>	IgG <sub>1</sub>	Exoespora	18-50, 55-60	IFI, Western blot
		M <sub>3</sub> 3D <sub>8</sub>	IgG	ND	20, 24, 60	IFI, Western blot
		M <sub>3</sub> 4D <sub>7</sub> , M <sub>3</sub> 4D <sub>8</sub>	IgG	Endoespora	22, 48, 50, 55-60	IFI, Western blot
		M <sub>3</sub> 3F <sub>10</sub>	IgG	ND	60	IFI, Western blot
		M <sub>3</sub> 3B <sub>8</sub> , M <sub>3</sub> 3H <sub>6</sub> , M <sub>3</sub> 4F <sub>6</sub>	IgG	Tubo polar	60	IFI, Western blot

ND: no descrito en el estudio. 1: mediante Western blot.

**Tabla 1.1. (Continuación).** Anticuerpos monoclonales múridos obtenidos para la detección de microsporidios. Obtenido y ampliado de Izquierdo, 2007.

Especie	Referencia	Anticuerpo	Isotipo	Reconocimiento celular	Reconocimiento antigénico (kDa)	Aplicación en el estudio
<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	Thellier y col., 2001	5H2-2B12	IgG <sub>1</sub>	Exoespora	31-45	IFI, Western blot
	Hayman y col., 2001	11B2	IgG	Exoespora	50	IFI, Western blot
	Bouladoux y col., 2003	7G7	IgG	Exoespora	150	IFI, Western blot
		M <sub>1</sub> .6C <sub>1</sub> .2C <sub>11</sub>	IgG	Exoespora	125	ELISA, IFI
	Enriquez y col., 1997b, 1998	3B6	IgG <sub>2b</sub>	Exoespora	34, 40, 46, 53, 63, 102, 117	IFI, Western blot
	Delbac y col., 1998	EC 102	IgM	Tubo polar	28, 35, 55	IFI, Western blot
	Bohne y col., 2000	11A1	IgG <sub>1</sub>	Exoespora	51	IFI, Western blot
	Sak y col., 2004	P2/B12	IgG <sub>2</sub>	Exoespora	98	IFI, ELISA
		P5/H1	IgG <sub>2</sub>	Exoespora	50, 98	IFI, ELISA
		P9/A5	IgG <sub>1</sub>	Endoespora	58, 98	ELISA
		P9/C10	IgG <sub>2</sub>	Exoespora	50, 98	IFI, ELISA
	Mo y col., 2004	EC8C12	IgG <sub>3</sub>	Exoespora	56	IFI, Western blot
		EC14E10	IgG <sub>2a</sub>	Exoespora	56	IFI, Western blot
		EC14D10	IgG <sub>1</sub>	Exoespora	56	IFI, Western blot
		EC11C5	IgG <sub>3</sub>	Exoespora	45	IFI, Western blot
		EC10G4	IgG <sub>3</sub>	Exoespora	43	IFI, Western blot
		EC7D5	IgG <sub>3</sub>	Exoespora	41	IFI, Western blot
		EC10E7	IgG <sub>3</sub>	Exoespora	121	IFI, Western blot
	Furuya y col., 2008	MAb1	IgE	Tubo polar	52	ELISA, Western blot
		MAb2	IgE	Tubo polar	52	ELISA, Western blot
		MAb4	IgE	Tubo polar	52	ELISA, Western blot
<i>Encephalitozoon hellem</i>	Aldras y col., 1994	C12, E9, E11	IgM	Exoespora/Tubo polar	52, 53, 55, 60, 62	IFI, ELISA, Western blot
	Visvesvara y col., 1994	ED4H10B11/B12	IgG <sub>1</sub>	Exoespora	18, 28.5, 30, 36, 40, 109	IFI, Western blot
	Enriquez y col., 1997b, 1998	3B6	IgG <sub>2b</sub>	Exoespora	53, 63, 102, 117	IFI, Western blot
	Luján y col., 1998	15C8	IgM	Exoespora	40, 50, 60	IFI, Western blot, Dot blot
		2B7	IgG <sub>3</sub>	Exoespora	40, 50, 60	IFI, Western blot, Dot blot
		17F3	IgM	Exoespora	Ausencia de reactividad <sup>1</sup>	IFI, Western blot, Dot blot
		10D3	IgM	Tubo polar	55	IFI, Western blot, Dot blot
	Croppo y col., 1998	ED4H6B3/A4	IgG <sub>1</sub>	Exoespora	16, 25, 28, 40, 48, 90, 120	IFI, Western blot
		ED4H6B1/G4	IgG <sub>1</sub>	Exoespora	16, 25, 28, 40, 48, 90, 120	IFI, Western blot
		ED4H10B11/B12	IgG <sub>1</sub>	Exoespora	16, 25, 28, 40, 48, 90, 120	IFI, Western blot
		ED4H10H5/C12	IgG <sub>1</sub>	Exoespora	16, 25, 28, 40, 48, 90, 120	IFI, Western blot
		DA4E9D8/B3	IgG <sub>1</sub>	Exoespora	15, 18, 20, 75, 120	IFI, Western blot
		DA4BB6E3/G6	IgG <sub>1</sub>	Exoespora	16, 25, 28, 40, 48, 90, 120	IFI, Western blot

ND: no descrito en el estudio. 1: mediante Western blot.

**Tabla 1.1. (Continuación).** Anticuerpos monoclonales múridos obtenidos para la detección de microsporidios. Obtenido y ampliado de Izquierdo, 2007.

Especie	Referencia	Anticuerpo	Isotipo	Reconocimiento celular	Reconocimiento antigénico (kDa)	Aplicación en el estudio
	Mo y col., 2002	HB6F10, HB56B12	IgG <sub>3</sub>	Exoespora	60	IFI, Western blot
		HB84H4, HB120F8	IgG <sub>3</sub>	Exoespora	60	IFI, Western blot
		HB10H5, HB20D6	IgG <sub>2a</sub>	Exoespora	68	IFI, Western blot
		HB27D11, HB29F4	IgG <sub>2a</sub>	Exoespora	68	IFI, Western blot
		HB37G9, HB39H1	IgG <sub>2a</sub>	Exoespora	68	IFI, Western blot
		HB11C3, HB21E1	IgG <sub>3</sub>	Exoespora	68	IFI, Western blot
		HB46E5, HB58D9	IgG <sub>3</sub>	Exoespora	68	IFI, Western blot
		HB85H5, HB94F6	IgG <sub>3</sub>	Exoespora	68	IFI, Western blot
		HB110H5, HB111D1	IgG <sub>3</sub>	Exoespora	68	IFI, Western blot
		HB11F3, HB82G2	IgG <sub>3</sub>	Exoespora	13	IFI, Western blot
		HB13H6	IgG <sub>1</sub>	Exoespora	39	IFI, Western blot
		HB23C10, HB97D12	IgG <sub>1</sub>	Exoespora	68	IFI, Western blot
		HB96G2	IgM	Exoespora	60	IFI, Western blot
<i>Nosema bombycis</i>	Shamim y col., 1997	MA-310	IgM	Exoespora	ND	ELISA
		MA-542	IgM	Exoespora	ND	ELISA
		MA-503	IgM	Exoespora	ND	ELISA, Aglutinación
		MA-515	IgM	Exoespora	ND	ELISA, Aglutinación
	Li y col., 2007	2B10	ND	Exoespora	50	IFI, Western blot
		2G10	ND	Exoespora	76, 54, 26	
	Zhang y col., 2007	1A6, 3C4	IgG <sub>1</sub>	ND	ND	ND
		3B1, 3C1, 3C3, 3F1	IgG <sub>2</sub>	ND	ND	ND
		3C2	IgG <sub>2</sub>	Exoespora	84	Western blot
<i>Nosema locustae</i>	Knoblett y col., 1996	D10-9-11	ND	Exoespora	ND	IFI, ELISA
		D55-12	ND	Tubo polar	ND	IFI, ELISA
	Keohane y col., 2001	3B1.23	IgM	Endoespora/tubo polar	40	Western blot
		19F9.24	IgG <sub>3</sub>	Endoespora/tubo polar	12-18	Western blot
<i>Glugea atherinae</i>	Pomport-Castillon y col., 1997	12H5, 12F9, 8B2	IgM	Exoespora	ND	IFI, Dot blot
		14A8, 10C6, 15C6	IgM	Exoespora	ND	IFI, Dot blot
		11E12	IgM	Exoespora	ND	IFI, Dot blot
<i>Glugea americanus</i>	Keohane y col., 1994, 1996	7E6.29.29	IgG <sub>1</sub>	ND	23, 42	Western blot
		2B12.8.7	IgG <sub>1</sub>	ND	27	Western blot
		8C10.4.32	IgG <sub>1</sub>	ND	34	Western blot
		3C8.23.1	IgG <sub>1</sub>	Tubo polar	43	Western blot
		6H3.20.1	IgM	ND	Bandas de EPM <sup>a</sup>	Western blot
		2B8.6.24	IgG <sub>1</sub>	ND	Banda de EPM <sup>a</sup>	Western blot
		2G2.5.1	IgG <sub>1</sub>	ND	Banda de EPM <sup>a</sup>	Western blot
		2G6.16.1	IgG <sub>2b</sub>	ND	12, 42, 80	Western blot

ND: no descrito en el estudio. α: elevado peso molecular.

La mayoría de estos anticuerpos detectan de manera específica antígenos de la esporo o del tubo polar, y algunos de ellos reconocen estados de desarrollo intracelular del parásito, lo que les otorga cierta ventaja sobre los métodos histoquímicos, que sólo tiñen la pared de la espora y los esporoblastos (Izquierdo, 2007).

En referencia a la especificidad de estos anticuerpos monoclonales, el hecho de que dentro de un mismo género, se hayan presentado reacciones cruzadas entre varias especies, como por ejemplo *Encephalitozoon*, y con especies de género distinto, por ejemplo *E. bienewisi*, puede estar indicando la existencia de antígenos comunes entre géneros y especies (Gool y col., 1997; Ghosh y Weiss, 2009). No obstante, estos problemas se pueden obviar en la mayoría de los casos utilizando los anticuerpos a una dilución adecuada (Weiss y col., 1992; Aldras y col., 1994; Mo y Drancourt, 2004). En general, los métodos de IF presentan una sensibilidad menor que las técnicas moleculares como la PCR, aunque en el caso de los anticuerpos monoclonales, tanto la sensibilidad como la especificidad dependen de las propiedades del anticuerpo y del cuidado con que se desarrolle la técnica en sus distintos pasos (Croppo y col., 1994; Croppo y col., 1997; Ghosh y Weiss, 2009).

Por tanto, los métodos de detección con anticuerpos poli o monoclonales, pueden considerarse como técnicas complementarias a las técnicas convencionales, y una alternativa a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en los casos en los que la presencia de inhibidores pudiera impedir la amplificación en esta técnica, problema que se presenta a menudo al utilizar muestras fecales (Croppo y col., 1994; Croppo y col., 1997; Ghosh y Weiss, 2009). No obstante, sólo dos de los anticuerpos monoclonales nombrados están disponibles comercialmente: el 6E52D9 y el 3B82H2, obtenidos por Acoceberry y col. (1999) y que se han incluido en un kit para la detección de *E. bienewisi* y *E. intestinalis* en muestras fecales (Bordier Affinity Products Cat. nº #8100 ).

En los estudios encaminados a la detección de anticuerpos en suero, se han utilizado gran variedad de pruebas serológicas para la detección de anticuerpos con isotipos G y M anti-microsporidios (principalmente *E. cuniculi*). Estas pruebas incluirían las técnicas de IFI, ELISA, *Western Blot* y otros métodos basados en la aglutinación (Shadduck, 1989; Shadduck y Greeley, 1989; Bouladoux y col., 2003; Jordan y col., 2006; Omura y col., 2007; Abou El Naga y col., 2008; Furuya y col., 2008b). Aunque pueden ser útiles para el diagnóstico de infecciones subclínicas, estos métodos no son recomendables para fines diagnósticos, dada su incapacidad para distinguir las infecciones agudas de las pasadas y las posibles reacciones cruzadas entre géneros y especies. Es más, se ha descrito que la presencia de anticuerpos anti-microsporidios en los sueros de pacientes inmunocomprometidos es muy variable, y que existe una alta prevalencia de estos anticuerpos en poblaciones aparentemente sanas e inmunocompetentes (Ghosh y Weiss, 2009).

#### 1.2.8.4. Técnicas moleculares.

Las técnicas moleculares son de gran utilidad en el estudio experimental con modelos animales, así como en estudios epidemiológicos de microsporidios. Gracias al diseño de cebadores para la identificación de los microsporidios que afectan tanto al hombre como a otros hospedadores animales, se ha podido reducir la necesidad de un examen ultraestructural, a través de técnicas como la MET o la histología que en muchos casos requieren métodos invasivos para su realización. Además, este tipo de técnicas además, se han utilizado para la identificación de nuevas especies o genotipos desconocidos, así como en el estudio de las relaciones filogenéticas y la taxonomía de este grupo (Ghosh y Weiss, 2009).

Los primeros métodos basados en la detección de ácidos nucleicos que se utilizaron para diagnóstico empleaban sondas marcadas que hibridaban específicamente con el ADN del organismo en estudio y emitían una señal detectable (fluorescencia, por ejemplo). Estas técnicas aún se utilizan pero se han ido sustituyendo por métodos que amplifican la secuencia diana, lo que supone un considerable aumento de la sensibilidad, además de facilitar análisis posteriores del producto amplificado, como por ejemplo, su secuenciación (Ghosh y Weiss, 2009). De estas técnicas moleculares, la más comúnmente utilizada es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para la extracción del ADN de muestras de cultivos o de tejidos, raspados corneales, aspirados duodenales y orinas, se utilizan métodos comerciales u otros convencionales (Velasquez y col., 1996) como es la digestión con proteinasa K seguida de extracción en fenol-cloroformo y una precipitación con etanol. También se puede aislar ADN de tejidos incluidos en parafina, o incluso de muestras previamente teñidas con Tricómico o Giemsa (Ghosh y Weiss, 2009).

En el caso de las esporas, se deben utilizar condiciones de extracción de ADN más agresivas, que permitan romper la pared de las mismas. En general, se utiliza una ruptura mecánica con bolas de vidrio combinada con la digestión rutinaria con proteinasa K (del Águila y col., 1997a; del Águila y col., 1997b; del Águila y col., 1997c). Se han descrito métodos que utilizan hipoclorito sódico, quitinasa, liticase, tiocianato de guanidina, formalina al 10% o hidróxido de potasio, ditiotritol, bromuro de hexadeciltrimetilamonio, o el hervido de la muestra.

En el caso de las muestras de heces, además de los métodos anteriormente descritos, se recomienda un tratamiento de la muestra con KOH, Tiocianato de Guanidina o Polivinilpirrolidona (PVP), o bien la dilución de las muestras para eliminar los inhibidores de la enzima polimerasa que puedan estar presentes (Velasquez y col., 1996; Ombrouck y col., 1997; Ghosh y Weiss, 2009).

El conocimiento de las secuencias génicas de los microsporidios es fundamental para el diagnóstico basado en técnicas moleculares como la PCR. Dado que son parásitos emergentes, los únicos genomas de microsporidio que se han secuenciado hasta la fecha son los de *E.*



*cuniculi* (Katinka y col., 2001) y *E. intestinalis* (Corradi y col., 2010). En el resto de los casos la mayoría de las secuencias que se han descrito pertenecen a genes que codifican ARNr. Debido a una mayor disponibilidad de estas secuencias en las bases de datos, así como a la presencia de regiones variables conservadas en las mismas, son los marcadores moleculares de la mayoría de los métodos de PCR para el diagnóstico y la diferenciación de especies de microsporidios. En Ghosh y Weiss, 2009, se puede encontrar una revisión de los cebadores que se han diseñado, algunos específicos de género y otros de especie.

Aunque en la mayoría de los casos se utiliza la electroforesis en gel de agarosa para la separación de los productos de amplificación según su tamaño, y su posterior visualización directa mediante bromuro de etidio iluminado con luz UV, algunos autores han desarrollado cebadores genéricos que permiten un tratamiento posterior con enzimas de restricción o hibridación con sondas específicas para poder diferenciar distintas especies (Fedorko y col., 1995; Ghosh y Weiss, 2009).

Hay descritos varios métodos de PCR anidada (*Nested-PCR*) que no sólo permiten el diagnóstico y la diferenciación de especies de microsporidios (Katzwinkel-Wladarsch y col., 1996; Katzwinkel-Wladarsch y col., 1997; Kock y col., 1997), sino además identificar los distintos genotipos dentro de las mismas, como es el caso de *Enterocytozoon sp.* (Sulaiman y col., 2003; Sulaiman y col., 2004).

También se ha empleado la PCR en tiempo real para la identificación de *Encephalitozoon spp.* y *E. bieneusi* en heces. Al utilizar un soporte multipocillo y que prescinda del procesado del producto amplificado aumenta el rendimiento de la técnica, reduciendo los tiempos de reacción y el riesgo de contaminación, lo que la hace especialmente indicada para el diagnóstico. Con respecto a la PCR cuantitativa o Q-PCR, ésta nos permite medir la carga parasitaria ya que no sólo detecta el ADN sino que puede cuantificarlo (Wolk y col., 2002; Menotti y col., 2003). Así mismo, analizando las curvas de disociación de los productos de amplificación se pueden diferenciar especies en infecciones múltiples o desconocidas (Ghosh y Weiss, 2009).

Algunos estudios se han basado en la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) para la detección de microsporidios. En contraste con la PCR, al realizarse directamente sobre las muestras, esta técnica es capaz de proporcionar información acerca de la localización y de la morfología de los parásitos, demostrado una mayor sensibilidad que las tinciones histoquímicas tradicionales. A pesar de esto, no es una técnica de elección para el diagnóstico clínico, ya que es muy laboriosa y no resulta tan sensible como la PCR, pues no amplifica la señal original. Aún así puede resultar de utilidad para estudiar la viabilidad de las esporas en muestras ambientales (Ghosh y Weiss, 2009).

Aunque los *microarrays* fueron originalmente diseñados para el análisis de la expresión de genes, recientemente se han aplicado al diagnóstico molecular de las microsporidiosis. Actualmente se ha desarrollado un *microarray* que detecta de manera simultánea *E. bieneusi*, *E.*

*cuniculi*, *E. hellem* y *E. intestinalis* en muestras clínicas fecales. Gracias a su soporte en chip, la tecnología de *microarrays* permite un gran rendimiento en cuanto al número de muestras procesadas, así como en su sensibilidad y especificidad. Además puede ser cuantitativa, ya que la intensidad de fluorescencia es proporcional a la cantidad de muestra. También se puede usar combinada con la PCR para aumentar la sensibilidad de la técnica (Ghosh y Weiss, 2009).

#### 1.2.8.5. Cultivos celulares.

Los cultivos celulares son técnicas que, aunque no se utilicen para diagnóstico de manera rutinaria por ser laboriosos, requerir personal e infraestructuras especializados y consumir mucho tiempo, en el campo de la investigación pueden constituir una aproximación muy útil, bien para confirmar los diagnósticos de género e incluso de especie, bien para aislar nuevas especies u obtener información biológica acerca de la interacción parásito-hospedador. Asimismo, los cultivos *in vitro* se han utilizado para estudios de cribado farmacológico frente a *Encephalitozoon cuniculi*, *Encephalitozoon hellem* y *E. intestinalis* (Franzen y Muller, 1999; García, 2002).

Debido a que son parásitos intracelulares obligados, no crecen en cultivos axénicos, y por tanto deben mantenerse en cultivos celulares (Vero-E6, HLF, MDCK, etc.) (Weber y col., 1994). Los primeros cultivos de microsporidios que se establecieron fueron aquellos relacionados con especies de cierta relevancia económica, como *N. apis* y *N. bombycis*, que infectan a las abejas de la miel y a los gusanos de seda respectivamente, *Ameson michaelis* y *Glugea stephani*, parásitos de los cangrejos y de peces respectivamente, *Nosema locustae* y *Varimorpha necatrix*, agentes biológicos utilizados en la agricultura contra plagas, *Ancaliia algerae*, que parasita a *Anopheles* spp., vector de *Plasmodium* sp., y *Vavraia culiceis*, que parasita a *Culex* spp., vector de filarias (Visvesvara, 2002).

Con respecto a las especies capaces de producir patología en el hombre, las especies pertenecientes al género *Encephalitozoon* spp., así como *Vittaforma corneae*, *Trachipleistophora hominis* y *Ancaliia algerae* han logrado establecerse en cultivos celulares estables utilizando líneas celulares de riñón de mono y conejo (Vero-E6 y RK-13), líneas de fibroblastos humanos fetales (MRC-5) y la línea de hígado de perro Madin-Darby (MDCK), entre otras. Así mismo, existen distintos medios de cultivo (EMEM, DMEM, etc.), suplementos (glutamina, suero fetal bovino, antibióticos, antifúngicos, etc.) y condiciones de cultivo distintas (a distintas temperaturas y porcentajes de CO<sub>2</sub>) para cada especie (Visvesvara 2002).

En el caso de *Encephalitozoon cuniculi*, las esporas utilizadas para establecer estos cultivos son aislados humanos procedentes de muestras de orina, lavado broncoalveolar, esputos y cerebro. En lo que se refiere a *E. hellem*, tejido conjuntivo y corneal o raspados de los mismos, mucosa nasal, orina, esputos y lavados broncoalveolar y de garganta. Para *E. intestinalis*, de orina, heces, esputos, mucosa nasal, lavado broncoalveolar y aspirado o biopsia

duodenales. En cuanto a *Vittaforma corneae*, el primer microsporidio procedente del hombre que logró propagarse en cultivo celular se estableció a partir de muestras de tejido corneal y orina. *Trachipleistophora hominis* logró establecerse en cultivo a partir de raspados corneales y biopsias musculares y, por último, *Ancaliia algerae* con muestras de raspados corneal y de piel (Weber y col., 1994; Visvesvara, 2002).

Desafortunadamente, una de las especies más prevalentes en el hombre, *Enterocytosoon bienewisi*, sólo se ha logrado establecer en cultivos a corto plazo (entre seis semanas y seis meses) a partir de muestras de heces y de aspirados o biopsias duodenales (Weber y col., 1994; Franzen y Muller, 1999; García, 2002; Visvesvara, 2002).

#### 1.2.8.6. Técnicas complementarias.

##### a) Proteómica.

La proteómica, basada en espectrometría de masas, proporciona un método objetivo y sin restricciones para la caracterización de patógenos, de modo que permite la identificación y la caracterización de dianas tanto para el diagnóstico como para el tratamiento de los mismos. Utilizando análisis basados en la espectrometría de masas (MALDI-TOF-MS y nanoLC-MS/MS) varios estudios han permitido identificar alrededor de 170 proteínas del proteoma de la espora de *E. cuniculi*, algunas con función desconocida y otras relacionadas con funciones de secreción, estructural, energética (metabolismo de carbohidratos), del control del ciclo biológico, la supervivencia del parásito y la formación y resistencia de la espora (Brosson y col., 2005; Texier y col., 2005; Xu y Weiss, 2005; Brosson y col., 2006; Peuvel-Fanget y col., 2006; Ghosh y col., 2011). En algunos casos los análisis proteómicos también han permitido identificar los antígenos de la espora de *E. cuniculi*, reconocidos por los anticuerpos presentes en sueros de pacientes (Furuya y col., 2008b) o para la identificación de nuevos orgánulos y su composición proteica (Ghosh y col., 2012).

Gracias también a los análisis espectrométricos se han identificado proteínas de la espora de otros microsporidios como la STL2 de *Loma salmonae* (parásito de peces salmónidos), que podrían estar implicadas en la inhibición de bacterias patógenas por opsonización y en la lisis tumoral mediada por macrófagos (Booy y col., 2005). En el caso de *N. bombycis* (causante de la pebrina en los gusanos de seda) se han descrito proteínas del tubo polar y de la pared de la espora, de las que se obtuvieron patrones específicos por MALDI-TOF-MS y MS/MS (Wang y col., 2007) y algunas de las cuales se han identificado como la SWP32 (de la exoespora) y las SWP25 (Wu y col., 2009), SWP26 (Li y col., 2009) y SWP30 (Wu y col., 2008) de la endoespora.

**b) Citometría de flujo.**

La citometría de flujo se ha utilizado para cuantificar y determinar la viabilidad de esporas de microsporidios como *E. intestinalis* (Santillana-Hayat y col., 2002) y *E. cuniculi* (Peterson y col., 1988) procedentes de cultivos celulares, así como para cuantificar las células infectadas con estados intracelulares en dichos cultivos (Franzen y col., 2004). También se ha descrito la utilización de esta técnica para aislar esporas de *E. bienewisi* de muestras de heces (Challier y col., 1994), y para comparar el contenido en ácidos nucleicos de esporas de microsporidios aisladas en peces (Amigo y col., 1994). Con respecto al diagnóstico, se ha utilizado en combinación con la inmunofluorescencia (utilizando anticuerpos poli y monoclonales) para la identificación de las distintas especies del género *Encephalitozoon* (Moss y col., 1999).

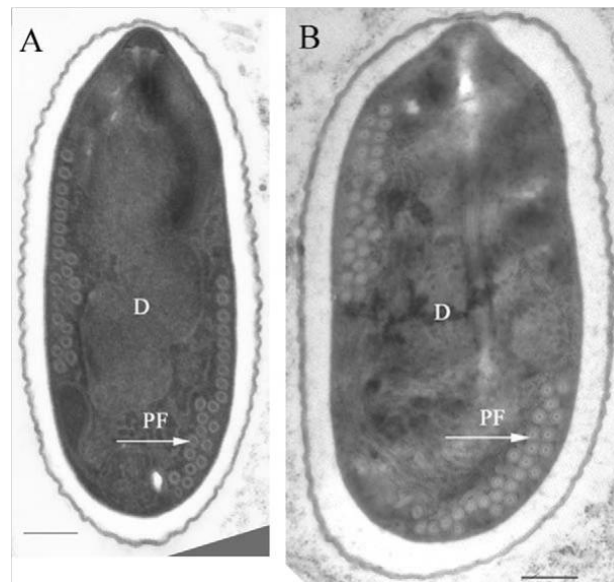
**1.2.8.7. Diagnóstico diferencial de *N. ceranae* y *N. apis*.**

La detección de *N. ceranae* no debe ser considerada un diagnóstico de la nosemosis tipo C desde un punto de vista patológico, ya que este diagnóstico recae en una serie de signos que no son fácilmente reconocibles y que varían dependiendo de las distintas áreas geográficas (Higes y col., 2010c). Dado que no existe ningún signo externo específico que permita distinguir las abejas infectadas con nosemosis, se hace necesaria la utilización de distintas técnicas para su detección. Hasta la fecha, la detección de *N. ceranae* ha recaído en el análisis microscópico y los métodos moleculares (OIE, 2008). A pesar de que estos parásitos y su ciclo de vida han sido descritos por muchos autores (Gray y col., 1969), sus estados vegetativos son difíciles de identificar con la microscopía óptica. Las primeras descripciones se han ido completando con características ultraestructurales y moleculares valiéndose de la microscopía electrónica.

Para una mejor diferenciación entre las infecciones producidas por estas dos especies, se aconseja la utilización de cortes histológicos, en los que se puede apreciar cómo se distribuyen los parásitos en las células del ventrículo recién infectado. Es característico de las infecciones por *N. apis* que las células epiteliales de *A. mellifera* en las que se encuentran las esporas maduras estén rodeadas de células vegetativas (merozoitos) del parásito, probablemente como resultado de la germinación intracelular de las esporas y la subsiguiente transmisión horizontal entre células epiteliales vecinas (Fries, 1989). Las infecciones por *N. ceranae* en su hospedador original, *A. cerana*, se presentan como focos aislados de una sola célula epitelial, en cuyo interior también se encuentran las esporas maduras que se han desarrollado. Esta situación, unida al hecho de que no se encuentren esporas vacías en las células infectadas, hace pensar que esta especie no ha desarrollado la capacidad de transmisión horizontal entre células (Fries y col., 1996). Sin embargo, cuando *N. ceranae* infecta *A. mellifera*, presenta un patrón similar al de *N. apis* en este hospedador, lo que descarta la histología como una técnica que permita el diagnóstico diferencial de las dos especies (Higes y col., 2007).

Las esporas de *Nosema* sp. se pueden visualizar fácilmente con microscopio con contraste de fases, ya que son muy refringentes (Higes y col., 2010c). Aún así, la diferenciación entre las esporas de *N. ceranae* y las de *N. apis* utilizando el microscopio óptico resulta bastante complicada. En general, las esporas de *N. ceranae* son de un tamaño ligeramente menor ( $4,7 \times 2,7 \mu\text{m}$ ) que las de *N. apis* ( $6 \times 3 \mu\text{m}$ ) (Fries y col., 1996). Sin embargo, si se comparan los rangos de tamaño que se han descrito para las esporas de ambas especies, existe un ligero solapamiento. De este modo, las esporas más pequeñas de *N. apis* podrían confundirse con las más grandes de *N. ceranae*. Otra de las características que se debe tener en cuenta es que en algunos casos, las esporas de *N. ceranae* se presentan ligeramente dobladas, lo que les da una apariencia menos regular que las de *N. apis* (Fries y col., 2006).

Aparte de las nombradas anteriormente, las mayores diferencias entre estas dos especies de *Nosema* aparecen al estudiar la ultraestructura de las esporas con microscopía electrónica (Figura 1.8.). El tubo polar en *N. apis* es de mayor longitud, presentando 26-32 vueltas (Fries, 1989) frente a las 20-23 que presenta el de *N. ceranae* (Fries y col., 1996).



**Figura 1.8.** Imagen ultraestructural mediante MET de la sección de las esporas de *Nosema ceranae* (A) y *Nosema apis* (B). D: Diplocarion; PF: Vueltas del tubo polar (flechas). Barras =  $0,5 \mu\text{m}$ . Fries y col., 2006.

En ausencia de unas características morfológicas claras que permitan un diagnóstico diferencial de las dos especies, para el diagnóstico e identificación de estos dos microsporidios de abejas actualmente se utilizan otras técnicas basadas en marcadores moleculares. La elevada sensibilidad de la técnica de PCR permite la detección de niveles muy bajos de infección producida por el parásito en todos los estados morfológicos de su ciclo biológico (Weiss y Vossbrinck, 1999) y la secuenciación de sus productos de amplificación permite la identificación y diferenciación de las dos especies de *Nosema* (Higes y col., 2006).

Como ya se ha descrito previamente, un marcador molecular utilizado para el diagnóstico de microporidios es la subunidad pequeña (SSU) del ARN ribosomal (16S rRNA). En estos parásitos, las secuencias de los genes que codifican para la 16S rRNA son más cortas y no comparten apenas homologías con las de otros eucariotas. Además son secuencias altamente conservadas. Muchas de estas secuencias se encuentran disponibles en la base de datos del *GeneBank*, y la mayoría pertenecen a *N. apis*, aunque Cornman y col. (2009) publicaron la secuencia de *N. ceranae* basándose en datos obtenidos por pirosecuenciación. Esta secuencia mostró un genoma muy reducido y con un elevado contenido en las bases AT. El hecho de que se encontraran distintas copias del gen que codifica rRNA, y que estas presentaran variaciones entre ellas hace que el genotipado de los distintos aislados resulte difícil (Higes y col., 2010c), algo similar a lo que ocurrió al estudiar las secuencias de los genes que codifican para la proteína del tubo polar PTP 1 (Hatjina y col., 2011). Resultaría de gran interés el genotipado de los distintos aislados de *N. ceranae* para poder relacionar las variaciones genéticas con las distintas sintomatologías observadas (Medici y col., 2012).

Actualmente las muestras que se utilizan para la detección de *Nosema* mediante técnicas moleculares son macerados de abejas o de sus aparatos digestivos diseccionados (Martin-Hernandez y col., 2007), y en algunos casos muestras de miel (Giersch y col., 2009; Botias y col., 2012).

Se han diseñado cebadores específicos de especie para *N. apis* (Webster y col., 2004; Chen y col., 2008; Nabian y col., 2011) y *N. ceranae* (Chen y col., 2008; Nabian y col., 2011; Suwannapong y col., 2011) y específicos de género, para *Nosema* sp., los cuales originan dos productos de PCR de distinto tamaño para las dos especies (Higes y col., 2006; Huang y col., 2008; Williams y col., 2008b). También se ha utilizado una PCR con electroforesis capilar para detectar *Nosema* spp. (Fernandez y col., 2012). Así mismo, se han desarrollado métodos basados en el análisis de polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP-PCR) de la SSU rRNA para diferenciar entre *N. apis* y *N. ceranae* (Higes y col., 2006; Klee y col., 2007; Giersch y col., 2009; Tapasztó y col., 2009; Stevanovic y col., 2011), una PCR *Multiplex* doble (Martin-Hernandez y col., 2007), que permite el diagnóstico simultáneo de las dos especies en la misma reacción (método recomendado por la OIE, 2008) y finalmente una PCR múltiple cuantitativa en tiempo real (Q-PCR), lo que no sólo permite la detección simultánea de las dos especies sino la cuantificación de la carga parasitaria (Cox-Foster y col., 2007; Chen y col., 2009a; Bourgeois y col., 2010; Forsgren y Fries, 2010; Hamiduzzaman y col., 2010; Traver y Fell, 2011b; Copley y Jabaji, 2012; Martínez y col., 2012).

El recuento de esporas no es una medida fiable de la salud de la colmena, ya que su sensibilidad está directamente relacionada con el número de abejas analizadas (Higes y col., 2010c; Traver y Fell, 2011b; Smart y Sheppard, 2012) y no tiene en cuenta las formas inmaduras del parásito (Martin-Hernandez y col., 2009), por lo que no es directamente proporcional a la carga parasitaria de la muestra (Meana y col., 2010). Un indicador más útil para valorar la importancia de la infección en la colmena sería la proporción de abejas pecoreadoras, o en todo caso, la media del recuento de esporas en este tipo de abejas. Se recomienda la

utilización de las abejas más viejas y recogidas de la entrada de la colmena y no de los panales centrales, ya que las abejas del interior presentan cargas parasitarias menores, por lo que se subestima la carga parasitaria (Meana y col., 2010). Algunos autores recomiendan el intestino medio como la muestra de elección para la detección y cuantificación de *N. ceranae* mediante técnicas moleculares, debido a su alta carga de esporas y a la poca variabilidad entre muestras, lo que permite una mayor reproducibilidad de los resultados (Bourgeois y col., 2012).

En cuanto al cultivo celular de estos microsporidios, aunque se han establecido cultivos de numerosas especies del género *Nosema* que parasitan insectos como *N. bombycis*, *N. furnacalis* o *N. pyrausta* (Visvesvara, 2002), sólo se ha logrado desarrollar un modelo de cultivo a corto plazo para *N. ceranae* y *N. apis* (Gisder y col., 2010b). Dado que no existen líneas celulares estables de abeja, se utilizó un cultivo heterólogo con células de lepidóptero, la línea IPL-LD-65Y, establecida a partir de los ovarios de la polilla *Lymantria dispar*. Gracias a éste cultivo, se pudo estudiar el ciclo de estos parásitos y describir formas de desarrollo hasta entonces desconocidas (apartado 1.2.2.1.a.), utilizando tanto la tinción de Giemsa como técnicas de FISH.

Mediante la espectrometría de masas, Bromenshenk y col. (2010) identificaron péptidos de 10 especies distintas de *Nosema* en muestras de colmenas colapsadas o a punto de colapsar. Debido a la existencia de secuencias homólogas compartidas entre los distintos péptidos dentro del género, estos se separaron en dos grupos utilizando análisis de *cluster* (Bromenshenk y col., 2010).

A pesar de que se han desarrollado anticuerpos monoclonales para la detección de otras especies del género, como *Nosema locustae*, parásito de los saltamontes (Knoblett y Youssef, 1996) o *N. bombycis* del gusano de la seda (Shamim y col., 1997), hay que resaltar el hecho de que hasta la fecha no se han descrito anticuerpos monoclonales frente a *N. ceranae* o *N. apis*. Sin embargo, si se han producido anticuerpos policlonales frente a la pared de la espora de *N. ceranae* utilizando tecnología genómica de anticuerpos (*Genomic Antibody Technology* o GAT), los cuales se han utilizado en el desarrollo de un método de ELISA para la identificación de este organismo (Aronstein, 2010; Aronstein y col., 2011; Aronstein y col., 2013).

### 1.2.9. CONTROL Y TRATAMIENTO DE LA NOSEMOSIS.

Otra línea de estudio deriva del control y el tratamiento de la infección por *Nosema* (Nosemosis). El control de las enfermedades que afectan a las abejas de la miel es de gran importancia para el mantenimiento de su papel como productores de alimentos (miel, polen, etc.), así como de polinizadores de cultivos y vegetación salvaje (Higes y col., 2010c).

Se ha descrito para *N. apis* una temperatura máxima de proliferación a 37°C y se ha señalado como las colmenas de abejas infectadas por este parásito se recuperan al

almacenarlas a esta temperatura (Martin-Hernandez y col., 2009; Higes y col., 2010a). Sin embargo, hasta la fecha, las infecciones por *N. apis* se han tratado con el antibiótico fumagilina (diciclohexilamonio) (Katznelson y Jamieson, 1952), obtenido del hongo *Aspergillus fumigatus*, que inhibe el desarrollo intracelular del parásito. Sin embargo, este antibiótico no es efectivo contra otras especies de *Nosema*, como por ejemplo *N. bombi*, que infecta abejorros (Género *Bombus*). Varios estudios han demostrado que la fumagilina controla la infección por *N. ceranae* reduciéndola temporalmente y evitando el colapso de las colmenas, aunque no es capaz de proteger frente a posibles reinfecciones (Higes y col., 2008a; Williams y col., 2008a; Higes y col., 2009c).

Debido a que las estrategias de control con antibióticos están perdiendo eficacia por la aparición de resistencias (Williams y col., 2008b), y a que la presencia de residuos de los mismos en los alimentos puede tener efectos adversos en la salud humana (Molina y col., 2002), el uso la Fumagilina ya no está permitido en Estados Unidos ni en la mayor parte de Europa. Por ello, se están investigando otras posibles alternativas para el tratamiento de esta infección, que incluyen, entre otras, sustancias como Thimerosal, Itraconazol, Thimol, Sinefungina, ácidos orgánicos, extractos herbales hidroalcohólicos, aceites esenciales, Lisozima y Fitoalexin Resveratrol (Porrini y col., 2010).

Así, por ejemplo, el ácido fórmico se utiliza para el control de *Varroa* en las colmenas de abejas de la miel. Se ha demostrado como la fumigación con dicho ácido sobre colmenas techadas durante el invierno reduce el aumento descrito en la proliferación de esporas de *Nosema* en esa estación. Sin embargo, no se ha determinado si las esporas producidas permanecen viables después del tratamiento (Underwood y Currie, 2009). Con respecto al timol y al resveratrol, ambos son capaces de disminuir las tasas de infección de las abejas, y el último además aumenta la esperanza de vida de las mismas (Maistrello y col., 2008). También se han probado numerosos productos derivados de extractos vegetales (Protofil, Vita Feed Gold®, Api-Herb y Nonosz®) (Higes y col., 2010c), así como la acidificación del sirope contra el desarrollo de la nosemosis (Porrini y col., 2010).

Así mismo, se han probado metabolitos producidos por las bacterias presentes en las colmenas y en el tracto digestivo de las abejas. En concreto se han utilizado bacteriocinas y surfactinas, demostrando una de estas últimas (Surfactina S2, producida por *Bacillus subtilis* C4) una actividad antiparasitaria al ser capaz de reducir el desarrollo de la nosemosis causada por *N. ceranae* sin mostrar ningún efecto tóxico en las abejas, y actuando tanto por exposición directa a las esporas como de manera indirecta en el tracto digestivo de las abejas. Las surfactinas poseen propiedades antifúngicas y antimicrobianas debido a su efecto detergente sobre las bicapas lipídicas. Un posible mecanismo de su acción antiparasitaria podría deberse a la rotura de la pared de la espora (exospora de naturaleza protéica y endospora quitinosa), haciéndola permeable y afectando a la germinación y replicación del parásito (Porrini y col., 2010).



Otra estrategia que se está estudiando actualmente es el silenciamiento de genes para reducir la presencia de ciertos patógenos en las abejas. Hay evidencias de que alimentando a las abejas hospedadoras con dsRNA (ARN de doble cadena) sintético para las proteínas transportadoras de ADP/ATP se consigue inhibir el crecimiento y desarrollo del parásito (Paldi y col., 2010).

Paralelamente, existen ciertas medidas de prevención frente a la nosemosis, relativas a la gestión de la apicultura, como el reemplazo de las reinas y el manejo higiénico de las colmenas, que resultan útiles para el control de la nosemosis (Higes y col., 2010c; Porrini y col., 2010). Así mismo, la continua cría selectiva de líneas de abejas tolerantes a la nosemosis (con bajas cargas parasitarias de *Nosema*) ha hecho que actualmente *N. ceranae* sea menos prevalente, como demuestran estudios realizados en colmenas de Dinamarca (Huang y col., 2012).

### **1.3. PRINCIPIOS BÁSICOS DE LA OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.**

Los anticuerpos son proteínas producidas por el sistema inmune en respuesta a las moléculas extrañas que entran en el organismo, denominadas antígenos. El reconocimiento molecular de dichos antígenos por parte del sistema inmune resulta en la producción selectiva de anticuerpos que se unen específicamente a ellos. Los anticuerpos son producidos y secretados por los linfocitos B activados (células plasmáticas) y circulan con la sangre y la linfa, donde se unen a sus antígenos específicos consiguiendo que sean eliminados de la circulación.

La capacidad del sistema inmune de producir anticuerpos capaces de unirse específicamente a antígenos puede aprovecharse para elaborar sondas para la detección de moléculas de interés en gran variedad de aplicaciones de investigación y diagnóstico. Además de su especificidad, el hecho de que los anticuerpos tengan una estructura relativamente uniforme y bien caracterizada, que permite purificarlos, marcarlos y detectarlos reproduciblemente con métodos generalizados, hace que sean idóneos para desarrollarlos como sondas.

Normalmente, como un solo antígeno puede presentar diferentes epítomos en su estructura, la respuesta inmunológica que se produce frente al mismo es heterogénea, dando lugar a distintos linajes de linfocitos B ( $L_B$ ) que, a pesar de originarse a partir de una misma célula madre, producen diferentes anticuerpos, cada uno de los cuales presenta especificidad frente a un epítomo concreto de dicho antígeno. Como consecuencia de esta respuesta, el suero de los animales albergará una batería heterogénea de clones celulares que producirán anticuerpos epítomo-específicos de distintos isotipos de Ig, los cuales se denominarán anticuerpos policlonales. En inmunoensayos, los anticuerpos policlonales resultan especialmente útiles como anticuerpos secundarios marcados.

Una célula plasmática ( $L_B$  activado) produce y secreta un solo isotipo de anticuerpo específico frente a un solo epítipo. Por tanto, los clones de  $L_B$  producen estas inmunoglobulinas que se denominan anticuerpos monoclonales. Todos los anticuerpos secretados por un clon de células B son idénticos, por lo que suponen una fuente de anticuerpos homogéneos con una especificidad definida y única. Aunque los  $L_B$  pueden aislarse de suspensiones de células del bazo o de ganglios extirpados de animales inmunizados, hay que destacar que éstos tienen un tiempo de vida limitado y no se pueden cultivar *in vitro* indefinidamente para producir anticuerpos de forma estable y permanente. Afortunadamente esta limitación se superó con el desarrollo de la tecnología de hibridomas, con la que los  $L_B$  aislados en suspensión se fusionan con células de mieloma (plasmacitoma) de la misma especie animal (normalmente ratones) para crear líneas celulares de híbridos productores de monoclonales potencialmente inmortales y que mantienen su capacidad de producir anticuerpos de manera indefinida.

La producción de anticuerpos a partir de un único clon de células B, es decir, monoclonales, no fue posible hasta el año 1975, en el que Köhler y Milstein desarrollaron la técnica de generación de hibridomas, gracias a la cual, en 1984, recibieron el Premio Nobel en Medicina junto con Niels Jerne (Köhler y Milstein, 1975). Los experimentos para generar, purificar y modificar (quimerización, humanización, fragmentación, etc.) estos anticuerpos para su uso como sondas antígeno-específicas se desarrollaron durante los años setenta y ochenta y han sufrido relativamente pocos cambios desde entonces.

Los anticuerpos poli y monoclonales se utilizan para realizar el diagnóstico de las microsporidiosis, así como sus estudios epidemiológicos. Además, pueden utilizarse en inmunofluorescencia o combinados con otras técnicas, como la microscopía electrónica (*Immunogold*) y la proteómica, para determinar la localización de los antígenos que reconocen en la estructura del parásito a lo largo de los distintos estados del ciclo biológico, y poder dilucidar la función de dichos antígenos logrando un mayor conocimiento de las interacciones biológicas e inmunológicas de la relación parásito-hospedador (Keohane y col., 1996; Bohne y col., 2000; Hayman y col., 2001; Dolgikh y Semenov, 2003; Brosnan y col., 2005; Peuvrel-Fanget y col., 2006; Southern y col., 2007; Wang y col., 2007; Wu y col., 2008).

Otro papel de los anticuerpos monoclonales es su posible uso terapéutico para el tratamiento de las microsporidiosis, por ejemplo, reduciendo la capacidad infectiva de las esporas de *Encephalitozoon* sp. (Enriquez y col., 1998), aumentando la fagocitosis de las esporas de *E. cuniculi* y reduciendo el número de las mismas (Sak y col., 2006) o reduciendo la germinación y proliferación de esporas de *N. bombycis* (Zhang y col., 2007) al tratar con este tipo de anticuerpos las esporas o los cultivos celulares infectados *in vitro*. Otra estrategia terapéutica consiste en la utilización de citoquinas en combinación con la terapia utilizada frente a microsporidios. Por ejemplo, se han realizado estudios en los que se ha dado el tratamiento combinado con IFN y anticuerpos específicos de *E. cuniculi* (Salát y col., 2008).

### 1.3.1. FASES EN LA OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.

La producción de anticuerpos implica la preparación del antígeno y su inoculación en animales de laboratorio (inmunización) para estimular la producción de anticuerpos específicos frente a la molécula inoculada, los cuales pueden ser recuperados con posterioridad en el suero del animal. Alternativamente, se pueden producir líneas de hibridomas que secreten un anticuerpo monoclonal determinado, mediante la fusión de las células de bazo secretoras de anticuerpos procedentes de animales inmunizados, con líneas celulares inmortales de mieloma. Como la producción de anticuerpos depende del sistema inmune del animal, que es un sistema biológico complejo, los resultados no son predecibles. Cada animal inmunizado, incluso cuando comparta una misma identidad genética, responderá de manera única a un mismo protocolo de inmunización, pudiendo generar distintos isotipos de anticuerpos frente a distintos epítomos de la molécula inoculada.

Utilizando un medio de selección adecuado, se pueden eliminar del producto de fusión aquellas células no fusionadas, para posteriormente seleccionar una línea celular de células híbridas (hibridoma) que secrete anticuerpos específicos frente al antígeno utilizado. Las células del hibridoma crecerán y se multiplicarán formando un clon que producirá las inmunoglobulinas deseadas. Posteriormente, dichas células se someterán a múltiples fases de clonación para asegurar la monoespecificidad del anticuerpo y la estabilidad del híbrido.

Los hibridomas seleccionados pueden conservarse congelados y cultivarse más tarde para producir el anticuerpo monoclonal específico cuando sea necesario. Los anticuerpos monoclonales son especialmente útiles como anticuerpos primarios en aquellas aplicaciones que requieran especificidad frente a un antígeno único y un suministro constante durante tiempos prolongados de uso.

Los hibridomas pueden crecer en cultivo (*in vitro*) para la recogida de anticuerpos en el sobrenadante, o en la cavidad peritoneal de un ratón (*in vivo*) para su recogida en altas concentraciones en el líquido ascítico.

Una vez seleccionados los anticuerpos monoclonales, se procede a su caracterización, en la que se evalúa la concentración de los mismos y el título (dilución de la muestra necesaria para la detección al utilizar una técnica determinada). Así mismo, se determina el isotipo del anticuerpo para poder elegir las técnicas adecuadas para su posible purificación y modificación posteriores.

En la Figura 1.9. se muestra un esquema general que resume las distintas etapas en el proceso de obtención de anticuerpos monoclonales. Es una metodología compleja que requiere la utilización de distintos tipos de técnicas, las cuales se describirán a continuación.

### 1.3.1.1. Inmunización.

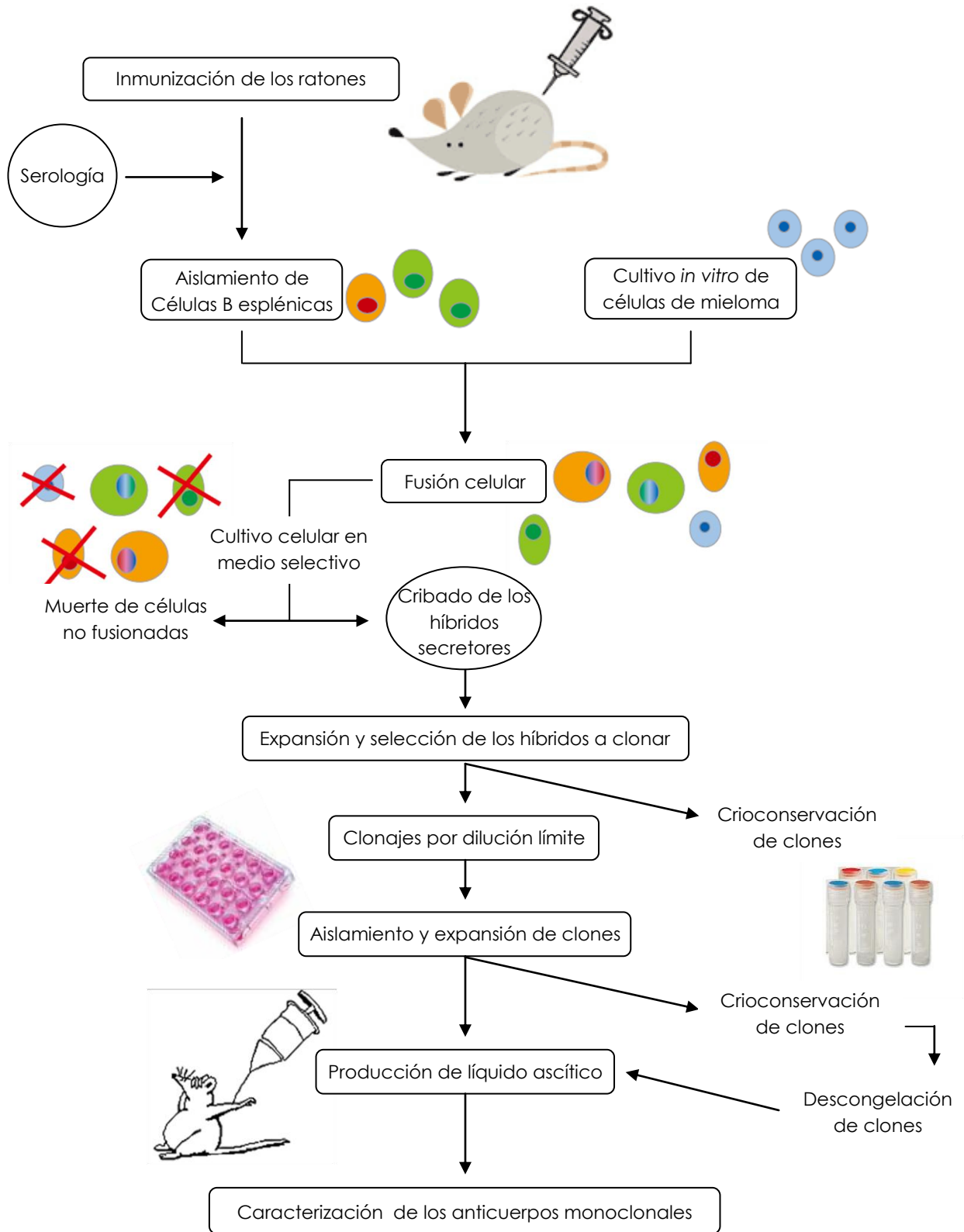
En el proceso de inmunización para la producción de anticuerpos monoclonales pueden utilizarse gran variedad de antígenos. En muchas ocasiones se inmuniza con antígenos impuros o múltiples, y posteriormente se realiza un cribado para seleccionar el anticuerpo monoclonal que identifique un antígeno específico. Esto supone una desventaja ya que se producen anticuerpos para muchos antígenos distintos, generalmente los más comunes, que no tienen por qué ser los requeridos. Para evitar esto, se pueden utilizar antígenos purificados o sintéticos, de manera que se aumentan las probabilidades de producir anticuerpos monoclonales específicos del antígeno deseado. El proceso de purificación de los antígenos suele implicar la desnaturalización de las moléculas, por lo que estos anticuerpos reconocerán esa forma desnaturalizada y no la nativa, como ocurre con aquellos anticuerpos producidos frente al antígeno impuro.

Aunque se han descrito numerosos protocolos de inmunización para la producción de anticuerpos monoclonales (Stahli y col., 1980), en general los cronogramas suelen coincidir en una preinmunización con adyuvante completo de Freund (ACF). Al inocular el antígeno comienza la activación de los  $L_B$  de los animales inmunizados, que se transformarán en células plasmáticas productoras de anticuerpos. Los clones de dichas células proliferan *in vivo* aumentando la probabilidad de obtener los híbridos que secreten el anticuerpo deseado.

Otro paso en el que coinciden los protocolos es en la administración de una dosis de recuerdo de antígeno sin adyuvante 3 ó 4 días antes de la fusión (Andersson y Melchers, 1978; Stahli y col., 1980). Éste recuerdo, al inducir el proceso de división de las células B, logra que la mayoría de estas células se encuentre en estado de diferenciación óptimo para la fusión celular, dado que las células tumorales del mieloma fusionan preferentemente con  $L_B$  recientemente activados (Köhler y Milstein, 1975). En general, los inóculos suelen inyectarse vía intraperitoneal, aunque en ocasiones el recuerdo se administra por vía intravenosa.

Resulta conveniente hacer un estudio del título sérico de los animales inmunizados, si no a lo largo del protocolo de inmunización para estudiar la evolución en la producción de anticuerpos, por lo menos antes del último recuerdo previo a la fusión, para asegurar que existe una respuesta inmune.

En el caso de requerir linfocitos humanos, éstos se obtienen tanto de la sangre periférica de donantes voluntarios previamente inmunizados, como de ganglios linfáticos eliminados quirúrgicamente para el tratamiento de tumores. Para aislar los monocitos y los linfocitos de los hematíes y los polimorfonucleares se realiza una centrifugación con *Ficoll Hypaque*®. Además, se utilizan agentes mitogénicos para estimular a los linfocitos de sangre periférica los cinco días previos a la fusión celular, ya que se obtienen mejores rendimientos produciendo un mayor número de híbridos secretores de IgG e IgM frente a los antígenos deseados (Olsson y Kaplan, 1980).



**Figura 1.9.** Desarrollo y obtención de anticuerpos monoclonales. Modificado de (CMPMA, 1999).

### 1.3.1.2. Líneas de mieloma utilizadas en la producción de hibridomas.

El mieloma o plasmacitoma es un neoplasma de células formadoras de anticuerpos (plasmáticas) (Yelton y Scharff, 1981). Cada tumor de mieloma proviene de la proliferación de un solo clon de células plasmáticas secretoras de un solo isotipo de inmunoglobulina (anticuerpos monoclonales), frente a antígenos normalmente desconocidos. Estos anticuerpos pueden detectarse fácilmente en el suero de quién padece dicho tumor (Raschke, 1980). Los plasmacitomas suelen inducirse en ratones BALB/c o NZB (cepas más susceptibles a la inducción de tumores) mediante la inoculación vía intraperitoneal de ceras, plásticos o aceites minerales (Raschke, 1980; Yelton y Scharff, 1981).

Las principales características que hacen a las líneas de mieloma idóneas para la producción de anticuerpos monoclonales son su capacidad de dividirse *in vitro* de manera indefinida y el hecho de que puedan criopreservarse y descongelarse sin perder sus características. Aún así, es preferible el uso de líneas que hayan perdido la capacidad de producir inmunoglobulinas o ascretoras, para evitar la producción de híbridos que sintetizen "mezclas de anticuerpos", lo que deriva en una disminución de la concentración del monoclonal deseado y en alteraciones de la especificidad antigénica (Kohler y Milstein, 1976; Yelton y Scharff, 1981).

Así mismo, para poder realizar la selección de los híbridos tras la fusión celular, se seleccionarán aquellas líneas de mieloma que hayan perdido la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT) o la timidina quinasa (TK), ambas necesarias para la ruta exógena (ruta de rescate o salvamento) de síntesis de precursores del ADN. Por otro lado, la síntesis de purinas "*de novo*" (ruta endógena) puede inhibirse con fármacos antifolato como la aminopterina, de manera que, en presencia de ésta, las células deben utilizar la ruta exógena (de salvamento) en la que la HGPRT y la TK sintetizan la purina, a partir del aporte externo de hipoxantina y timidina respectivamente. Por lo tanto, después de la fusión, las células carentes de estas dos enzimas (HGPRT<sup>-</sup> y TK<sup>-</sup>) no podrán utilizar la vía de salvamento y morirán en un medio de cultivo selectivo suplementado (HAT: hipoxantina, aminopterina, timidina). Sin embargo, aquellas células de mieloma que se hayan fusionado con las células esplénicas recibirán por parte de éstas las enzimas necesarias, de forma que dichos híbridos serán capaces de sintetizar ADN por la vía de salvamento y sobrevivirán en el medio selectivo.

A continuación en la Tabla 1.2. se resumen las principales líneas de mielomas utilizadas para la obtención de anticuerpos monoclonales.

**Tabla 1.2.** Líneas tumorales más utilizadas en la producción de anticuerpos monoclonales.

		DENOMINACIÓN	ORIGEN	SECRECIÓN	REFERENCIA
ORIGEN	Múrido	P3/X63-Ag8 (= P3)	Sublínea de MOPC-21	Secreta $\gamma 1, \kappa$	(Köhler y Milstein, 1975)
		P3/NS-1/1Ag4-1 (= NS-1)	Sublínea de MOPC-21	Secreta $\kappa$ tras la fusión	(Hudson, 1980)
		Sp2/0-Ag14 (= Sp-2)	Híbrido P3/X63-Ag8 y célula linfóide BALB/c	No secreta	(Schulman y col., 1978)
		P3/X63-Ag8.653 (= 653)	Deriva de la línea P3/X63-Ag8	No secreta	(Kearney y col., 1979)
		F(0)	Producto de fusión entre células Sp-2	No secreta	(Fazekas de St. Groth, 1980)
	Humano	SKO-007	Mutante de U-226	Secreta IgE	(Olsson y Kaplan, 1980)
		RPMI 8226	ND	Secreta $\lambda$	(Matsuoka y col., 1967)
		GM-1500	ND	Secreta IgM	(Croce y col., 1980)
		HMy-2	ND	Secreta IgG <sub>1</sub> ( $\kappa$ )	(Edwards y col., 1982)
		Karpas (707)	ND	Secreta $\lambda$	(Karpas y col., 1982)

ND = No descrito en el estudio;  $\gamma 1 =$  ;  $\kappa$  = cadena ligera  $\kappa$ ;  $\lambda$  = Cadena ligera  $\lambda$ .

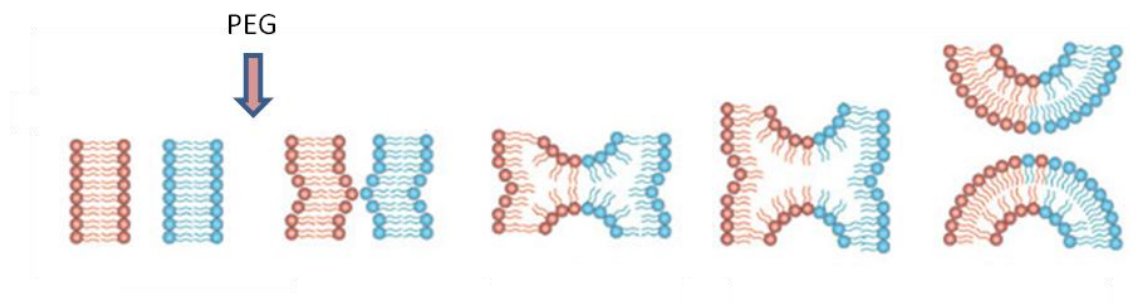
### 1.3.1.3. Fusión celular.

Generalmente, en una fusión celular se espera la obtención de un híbrido por cada  $2 \times 10^5$  células de bazo (Coll Morales, 1982). Por esta razón, tras la fusión debería encontrarse un clon por cada pocillo de cultivo y así poder aislar los híbridos productores de la inmunoglobulina deseada (específica) de aquellos no productores. La proporción de células mieloma:bazo (normalmente 1:5) es importante, ya que se ha demostrado que la formación de los híbridos es dependiente de la cantidad de estas últimas (Westerwoudt y col., 1984), y se indica cómo el exceso de células esplénicas puede aumentar la probabilidad de obtener híbridos debido a la diferencia de tamaño de ambos líneas celulares (Kohler y Milstein, 1976).

La fusión entre las células de mieloma y los esplenocitos de los animales inmunizados con el antígeno deseado se realiza en presencia de un agente fusionante. En primer lugar se utilizó el virus Sendai (Köhler y Milstein, 1975), pero el hecho de que sea necesario su cultivo *in vitro* y su preparación en el laboratorio ha hecho que se descarte en favor de otros agentes. Actualmente su utilización se restringe a la obtención de híbridos productores de IgM (Fazekas y Groth, 1980 ).

En la actualidad el polietilén-glicol (PEG) es el agente más utilizado para las fusiones celulares de mieloma y esplenocitos desde que se describiera su utilidad para este fin (Pontecorvo, 1975). Es un compuesto químico de alto peso molecular derivado del etilén-glicol por polimerización. La administración de este polímero en la fusión celular disminuiría la cantidad de agua libre (por su gran afinidad hacia ésta) lo que produciría la desorganización de la membrana celular (Lucy, 1978). A 37°C las membranas celulares se agruparían y las bicapas

lipídicas se harían más fluidas, por lo que los grupos polares perderían su orientación (Figura 1.10.). A medida que se diluye el PEG las células tenderían a tomar una forma esférica más estable, rompiendo las membranas en la zona de contacto donde los fosfolípidos se encontrarían desorientados, dando lugar a la célula híbrida.



**Figura 1.10.** Mecanismo de acción del PEG como agente fusionante. Modificado de *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 2005.

Para llevar a cabo las fusiones con PEG hay que guardar una serie de precauciones. En general, se prefieren aquellos polímeros con un peso molecular (Pm) entre 1000 y 4000 g/mol, ya que por debajo de este rango son demasiado tóxicos para las células y por encima resultan excesivamente viscosos para su manipulación. Se ha demostrado que utilizando PEG de 4000 g/mol al 50% (lo que supone una cantidad de agua libre igual a cero) se produce un mayor número de fusiones celulares, y cómo la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio es necesaria para que dicho proceso se lleve a cabo, al menos en concentraciones que no resulten tóxicas para las células (Blow y col., 1978; Goding, 1980). Con respecto a la temperatura, los mejores resultados se han obtenido al realizar las fusiones entre 30 y 37°C (Fazekas y Groth, 1980) y el rango de pH óptimo ha resultado ser de 7,4 a 8 (Norwood y Zeigler, 1982).

Como se puede deducir por todo lo expuesto anteriormente, una de las características que limitan el uso del PEG como fusionante de membranas es su toxicidad. Por ello, se han realizado estudios orientados a la reducción de dicha toxicidad como fusiones libres de  $\text{Ca}^{2+}$  (Schneiderman y col., 1979), utilización de fitohemaglutinina (Mercer y Schlegel, 1979) o dimetil-sulfóxido (Lovborg, 1982; Norwood y Zeigler, 1982).

#### 1.3.1.4. Mantenimiento y selección de los productos de fusión.

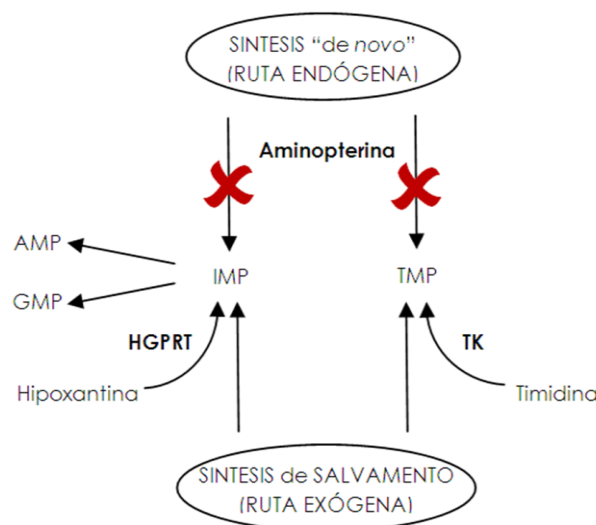
Como resultado de la fusión celular aparecerán distintas poblaciones celulares, linfocitos y células de mieloma no fusionados e híbridos, los cuales podrán ser de tres tipos: mieloma-mieloma, mieloma-linfocito y linfocito-linfocito. Todas ellas serán viables a largo plazo excepto los



linfocitos no fusionados y los híbridos linfocito-linfocito. Las células de mieloma sin fusionar y los híbridos mieloma-mieloma derivan de un mutante HGPRT<sup>-</sup>, por lo que serán no sobrevivirán en el medio selectivo HAT, permaneciendo viables sólo los híbridos mieloma-linfocito capaces de llevar a cabo la ruta metabólica exógena o de salvamento gracias a las enzimas aportadas por los linfocitos.

La selección de los híbridos mieloma-linfocito se basa en la capacidad de éstos de mantenerse viables en medios selectivos especiales, generalmente el medio HAT. Este método de selección (Littlefield, 1964) se basa en la biosíntesis de nucleótidos necesarios para la síntesis del ADN en las células. Existen dos rutas de biosíntesis de nucleótidos, la *de novo* y la de salvamento o rescate (Figura 1.11.).

La Aminopterina (ácido 4-aminofólico) presente en el medio selectivo HAT es un análogo del Ácido fólico capaz de unirse fuertemente a la enzima fólico reductasa bloqueando así la ruta *de novo* para la síntesis de nucleótidos (Hudson y Hay, 1980). La Aminopterina también bloquea la síntesis de de Glicina por lo que para la preparación del medio HAT se recomienda la utilización de medio RPMI-1640 que pueda compensar esa falta (Fazekas y Groth, 1980 ).

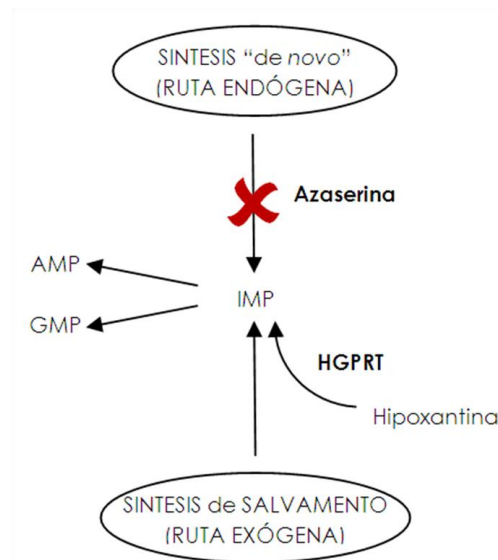


**Figura 1.11.** Esquema de la actividad de la Aminopterina en la ruta *de novo* para la síntesis de nucleótidos. IMP: Inosina-5'-monofosfato; TMP: Timidín-5'-monofosfato; AMP: Adenosín-5'-monofosfato; GMP: Guanosín-monofosfato; HGPRT: Hipoxantina guanina fosforribosil transferasa; TK: Timidina quinasa.

En lo que se refiere a la ruta de salvamento para la síntesis de nucleótidos, la enzima HGPRT se encarga de incorporar la hipoxantina suplementada en el medio HAT. Como las células de mieloma utilizadas para las fusiones carecen de esta enzima (apartado 1.3.1.1.) ni éstas ni los híbridos formados entre ellas (híbridos mieloma-mieloma) pueden llevar a cabo

ninguna de las dos rutas, por lo que acabarán muriendo (Choy y col., 1982). Por otro lado, los linfocitos al expresar la enzima HGPRT, la aportarán a los híbridos mieloma-linfocito, permitiendo la incorporación de la hipoxantina y la timidina presentes en el medio y, por tanto, la formación de los nucleótidos necesarios para su supervivencia, que será indefinida gracias al carácter tumoral aportado por las células de mieloma (Schulman y col., 1978; Hudson y Hay, 1980).

Aunque la utilización del medio HAT es la más generalizada, existen otros métodos para la selección de productos de fusión celular basados en la misma ruta bioquímica. La Azaserina es un agente anticitostático, inhibidor de actividades enzimáticas en las que interviene la glutammina. Al igual que la Aminopterina, interfiere en la síntesis *de novo* de las purinas, actuando sobre la enzima amino-fosforribosil-transferasa (Figura 1.12.), por lo que en su presencia sólo sobrevivirán los híbridos que posean la HGPRT aportada por el linfocito, gracias a la cual podrán incorporar la hipoxantina del medio (Choy y col., 1982).



**Figura 1.12.** Esquema de la actividad de la Azaserina en la ruta *de novo* para la síntesis de nucleótidos. IMP: Inosina-5'-monofosfato; AMP: Adenosín-5'-monofosfato; GMP: Guanosín-monofosfato; HGPRT: Hipoxantina guanina fosforribosil transferasa; TK: Timidina quinasa.

Con respecto a los híbridos viables, solamente se seleccionan aquellos que son secretores de inmunoglobulinas. Existe el problema de que los híbridos no secretores, al presentar una menor carga cromosómica, crecen mucho más rápidamente (Goding, 1980), con el problema añadido de la utilización de elevados porcentajes de suero bovino fetal como suplemento de los medios de cultivo. Como ya se ha mencionado anteriormente, un modo de evitar que los híbridos no secretores dominen numéricamente el cultivo sería sembrar el producto de la fusión celular a una concentración que estadísticamente sólo permita el

crecimiento de un híbrido por cada pocillo, pero habría que tener en cuenta que el crecimiento de los hibridomas en las primeras fases del cultivo celular es muy sensible a las diluciones. Además, los híbridos secretores son inestables en los primeros momentos de la fusión celular en los que podría producirse una pérdida de cromosomas que les hiciera perder la capacidad de producción de anticuerpos. La única opción para evitar el sobrecrecimiento de los híbridos no secretores en el cultivo es realizar la selección rápidamente clonando lo antes posible, para evitar la presencia de hibridomas no deseadas que crezcan a mayor velocidad que los híbridos buscados.

#### **1.3.1.5. Cribado de los híbridos secretores.**

Como ya se ha mencionado anteriormente, una vez distribuido el producto de la fusión en las placas de cultivo, la selección de los híbridos secretores de inmunoglobulinas específicas del antígeno deseado debe realizarse de forma rápida, para evitar un sobrecrecimiento de clones no secretores o productores de otro tipo de anticuerpos no específicos. En general, los métodos más utilizados para el cribado de los híbridos son el ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) o la IF (Inmunofluorescencia), técnicas que permiten el procesado de una gran cantidad de muestras (sobrenadantes de cultivos) de forma rápida y reproducible (Goding, 1980).

#### **1.3.1.6. Clonaje de los híbridos específicos.**

La finalidad del proceso de clonaje es que las distintas poblaciones de células del híbrido secretor de la inmunoglobulina específica provengan de un solo heterocarion, para que los anticuerpos monoclonales que produzcan sean homogéneos y monoespecíficos, garantizando su monoclonalidad (Coll Morales, 1982). Así mismo, las distintas etapas de clonaje servirán para evitar el sobrecrecimiento de poblaciones de células no secretoras o secretoras de inmunoglobulinas no específicas, que pueden aparecer principalmente en las primeras etapas del cultivo después de la fusión celular. Los clones obtenidos después de todos los clonajes deberían asegurar "monoclonalidad" así como estabilidad en su crecimiento y en la producción de anticuerpos.

Inmediatamente después de la fusión, en el primer clonaje, los híbridos productores suelen encontrarse en baja proporción debido a la pérdida de cromosomas que tiene lugar (Goding, 1980). Después, los subclones positivos se deben volver a clonar para ir seleccionándolos. A lo largo de los distintos subclonajes, un gran número de clones positivos que se detectan se pierden (sobrecrecen no secretores, pierden la capacidad de producir, etc.), por lo que conviene hacerlo lo más rápido y frecuentemente posible una vez se hayan detectado.

Se han descrito distintos métodos de clonaje. El más común es el método de clonaje por dilución límite en medio líquido, en el que los híbridos positivos para la secreción del anticuerpo específico deseado se diluyen para obtener 10, 5, 1 y 0,5 células por pocillo, asumiendo que alguno de los pocillos sembrados contendrá clones originados a partir de una sola célula. Para aumentar la eficiencia de los clonajes se utiliza un sustrato de alimentación (*feeder layer*), cuyas células liberan determinados factores de crecimiento que estimulan la división celular de los híbridos (Lernhardt y col., 1978). Se suelen utilizar como sustrato timocitos (Lernhardt y col., 1978), células esplénicas (Levy y col., 1978) o células peritoneales (Hengartner y col., 1978).

Otro método de clonaje es en medio semisólido o agar blando, que utiliza dos capas de agar. La capa superior, de 0,3% (peso/volumen) contiene las células que se desean clonar, y se coloca sobre otra inferior, de 0,5% (peso/volumen). En algunos casos se añade una capa de sustrato de alimentación (macrófagos, fibroblastos o células 3T3 confluentes) entre las dos capas de agar. De una a dos semanas después del inicio del clonaje las colonias de células son visibles y pueden recuperarse para continuar su cultivo en medio líquido.

Otro método de clonaje que cabe mencionar es el realizado con citómetro de flujo equipado con un separador celular activado por fluorescencia o FACS® (*fluorescence-activated cell sorter*). Con esta técnica, mediante el empleo de anticuerpos monoclonales específicos de las distintas poblaciones celulares conjugados con distintos fluorocromos, o bien utilizando esferas de látex fluorescentes que pueden unirse a antígenos celulares, se pueden aislar células de una suspensión heterogénea al inyectarla en el citómetro. Éste someterá célula a célula a una luz láser y las separará automáticamente en función de la fluorescencia emitida (Parks y col., 1979).

#### **1.3.1.7. Producción de anticuerpos monoclonales en elevadas concentraciones.**

Para la obtención de concentraciones elevadas de anticuerpos monoclonales el tratamiento al que serán sometidos los hibridomas será distinto dependiendo de si estos son de origen murino o humano.

Los hibridomas de ratón clonados se pueden expandir en cultivos en masa. Esta expansión debe realizarse de manera gradual mediante diluciones sucesivas y comprobando periódicamente la producción y la concentración de anticuerpo en los sobrenadantes de los cultivos, para controlar una posible pérdida de la capacidad de secreción. Como algunos híbridos son muy sensibles a las diluciones, puede resultar conveniente utilizar un sustrato de alimentación (*feeder layer*). Las concentraciones de anticuerpos secretados en los sobrenadantes de los cultivos oscilan entre los 5 y los 50 µg/ml (Goding, 1996). Si las necesidades de anticuerpos monoclonales son superiores a éstas, puede optarse por otros métodos *in vitro* o la producción de los mismos *in vivo*.

En cuanto a las alternativas *in vitro* (CMPMA, 1999) existen, por ejemplo, los métodos de cultivo en lotes, los cuales consisten en cultivar el hibridoma en grandes lotes y purificar los anticuerpos producidos en el sobrenadante del medio de cultivo. Estos métodos hacen necesarios volúmenes muy elevados de medio, que utiliza suero bovino fetal. Éste puede ser retirado cuando la línea es estable, aunque en muchos casos esto no llega a ocurrir. Las concentraciones de anticuerpos que se obtienen están por debajo de los 20 µg/ml cuando la mayoría de las aplicaciones en la investigación requieren concentraciones de 0.1-10 mg/ml.

Existen métodos que incrementan la concentración de oxígeno disuelto en el medio, y por tanto la viabilidad y densidad de las células, que producirán mayor cantidad de anticuerpos aunque nunca pasarán de unos pocos µg/ml. Se han descrito métodos de purificación y concentración de anticuerpos, pero algunos de ellos producen la desnaturalización de los anticuerpos reduciendo su actividad hasta en un 42% (CMPMA, 1999).

En los sistemas basados en membranas permeables, las células y los anticuerpos producidos se aíslan en una cámara separada por una membrana de otro compartimento que contiene el medio de cultivo. Dicha membrana sólo deja pasar los nutrientes y los productos de excreción, por lo que los anticuerpos quedan concentrados en la cámara obteniendo rendimientos de 10-160 mg. En cuanto a las dificultades técnicas, no son mucho mayores que con los cultivos por lotes; sin embargo resultan más caras.

En el caso de los biorreactores se obtienen rendimientos de 500 mg o superiores, pero suponen el método más caro y que implica un mayor grado de dificultad técnica, por lo que sólo se utiliza para producir grandes cantidades de anticuerpos monoclonales.

Para algunos usos, aparte de grandes concentraciones de anticuerpos monoclonales, también puede requerirse la purificación de los mismos. Existen varios métodos descritos con este fin, como son la diálisis del líquido ascítico o los sobrenadantes de cultivos y de biorreactores, frente a agua destilada para precipitar las inmunoglobulinas o la precipitación de las mismas con Sulfato de Amonio y posterior diálisis. En ambos protocolos se puede continuar con la técnica de cromatografía para obtener un producto de elevada pureza (Andrew y col., 2009). Se emplean mucho las cromatografías de afinidad en columnas de Sepharosa, las de intercambio iónico en columnas de DEAE (Biogel, Sepharosa y Sephacel) y las de afinidad con columnas anti-Ig-Agarosa. Dado que existen protocolos de purificación especialmente indicados para cada molécula de inmunoglobulina, resulta muy útil conocer el isotipo de los anticuerpos que se pretende purificar.

En referencia a la producción de anticuerpos monoclonales *in vivo*, como los hibridomas, se pueden inyectar en ratones, que desarrollarán un tumor con producción de líquido ascítico (Goding, 1996). Cuando se inoculan vía intraperitoneal en un ratón, las células del hibridoma se multiplican y producen líquido ascítico en su abdomen. Dicha ascitis se caracteriza por poseer un gran contenido proteico (de 2 a 10 mg/ml), principalmente debido a la albúmina, pero también a una alta concentración de anticuerpos. Su concentración de

glucosa, sodio y potasio es la misma que la de la sangre. También puede contener células mesoteliales y linfocitos. El líquido ascítico se encuentra en equilibrio dinámico con la sangre y presenta un ritmo de intercambio del 80%/hora.

Normalmente se utilizan ratones histocompatibles con los híbridos que se inoculan, de 10 a 12 semanas de edad, ya que ratones mayores producen menores cantidades de anticuerpos (Tung, 1983). El uso de *Pristane* (2, 6, 10 14-tetrametil-pentadecano) previo al inóculo aumenta la frecuencia de implantación de tumor ascítico (Oi y Herzenberg, 1980). Una vez producida la ascitis, el líquido ascítico se extrae periódicamente por punción intraperitoneal, hasta un máximo de tres punciones. Después de cada punción, este líquido se vuelve a acumular rápidamente, con la consiguiente distensión del abdomen. La producción de ascitis por ratón es de 2 a 10 ml con una concentración de anticuerpos de 1 a 10 mg/ml aproximadamente (Galfre y Milstein, 1981).

#### **1.3.1.8. Conservación de hibridomas y de anticuerpos monoclonales.**

Durante el proceso de obtención y clonaje de híbridos productores de anticuerpos monoclonales, pueden perderse muchas líneas por distintos factores, como el sobrecrecimiento de híbridos no secretores, contaminación de los cultivos, etc. Por eso se recomienda la crioconservación en nitrógeno líquido de alícuotas de los híbridos en cada una de las distintas etapas del proceso. Uno de los medios de congelación más empleados es el Dimetil Sulfóxido (DMSO) diluido al 10% en suero fetal bovino.

Así mismo, una vez obtenidos los anticuerpos monoclonales, estos pueden conservarse en distintos medios y distintas condiciones de temperatura dependiendo del caso. En general son muy sensibles a los ciclos de congelación-descongelación, por lo que dicha práctica deberá restringirse en la medida de lo posible. Los sobrenadantes de cultivos que contienen anticuerpos monoclonales pueden almacenarse a 4°C en presencia de 0,1% de azida sódica (NaN<sub>3</sub>), que mantiene su estabilidad. Los sueros policlonales de animales inmunizados y los líquidos ascíticos se pueden congelar a -70°C en pequeñas alícuotas. Aquellos anticuerpos monoclonales purificados por el método de precipitación en Sulfato Amónico se conservan a 4°C en soluciones salinas tamponadas (PBS por ejemplo) entre 1 y 10 mg/ml en presencia de 0,1% de NaN<sub>3</sub>.

#### **1.3.2. TECNOLOGÍAS APLICADAS EN LA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.**

Como ya se ha comentado en esta introducción, el primer paso necesario para la generación de hibridomas consiste en la inmunización de un ratón con el antígeno de interés, del que después se extraerán los linfocitos B activados. Estas células plasmáticas productoras de

anticuerpos frente al antígeno inoculado se fusionan con células inmortales de mieloma (células tumorales inmortales de la médula ósea). Tras seleccionar (en distintos medios selectivos de cultivo celular) los hibridomas productores de los anticuerpos específicos frente al antígeno deseado, se cultivarán para producir el anticuerpo monoclonal en elevadas concentraciones. Después de una serie de clonajes, dado que las células que derivan de los hibridomas seleccionados proceden de una misma célula y por tanto son clones, los anticuerpos que se recuperan de estos cultivos son monoclonales, lo que garantiza su monoespecificidad.

El uso terapéutico de los anticuerpos de origen murino presenta importantes limitaciones derivadas de su origen no humano, como por ejemplo una corta vida media en sangre, un reclutamiento ineficiente de funciones efectoras y ciertos problemas inmunológicos. En una proporción importante de pacientes se desarrolla una respuesta de anticuerpos humanos anti-inmunoglobulinas murinas (HAMA, del inglés *Human Anti Murine Antibodies*), provocando en algunos casos la pérdida de eficacia, y en otros dicha reacción inmune generalizada (rechazo), circunstancia ha limitado las aplicaciones terapéuticas de estos anticuerpos.

#### **1.3.2.1. Quimerización y humanización de anticuerpos monoclonales.**

El problema comentado anteriormente ha dado lugar al desarrollo de nuevas tecnologías de producción de anticuerpos monoclonales en las que, utilizando secuencias génicas híbridas obtenidas gracias a la Ingeniería Genética, es posible sintetizar anticuerpos monoclonales quiméricos, humanizados o completamente humanos (Kim y col., 2005). Los procesos de quimerización y humanización permiten disminuir el rechazo por parte de los pacientes y el desarrollo de anticuerpos frente a los anticuerpos monoclonales administrados, garantizando la afinidad y especificidad de unión de estos últimos.

En los anticuerpos quiméricos, las regiones variables e hipervariables (CDR) proceden de ratón (30 %) y las regiones constantes son humanas (70 %), estructura con la cual se consigue reducir la respuesta inmune que se produce frente a los anticuerpos murinos. En los anticuerpos humanizados solamente las regiones CDR de las regiones variables proceden de ratón (10 %), siendo el resto del anticuerpo de origen humano (90 %), y por último, los humanos son en su totalidad de origen humano, reduciendo así el riesgo de producir una respuesta inmune.

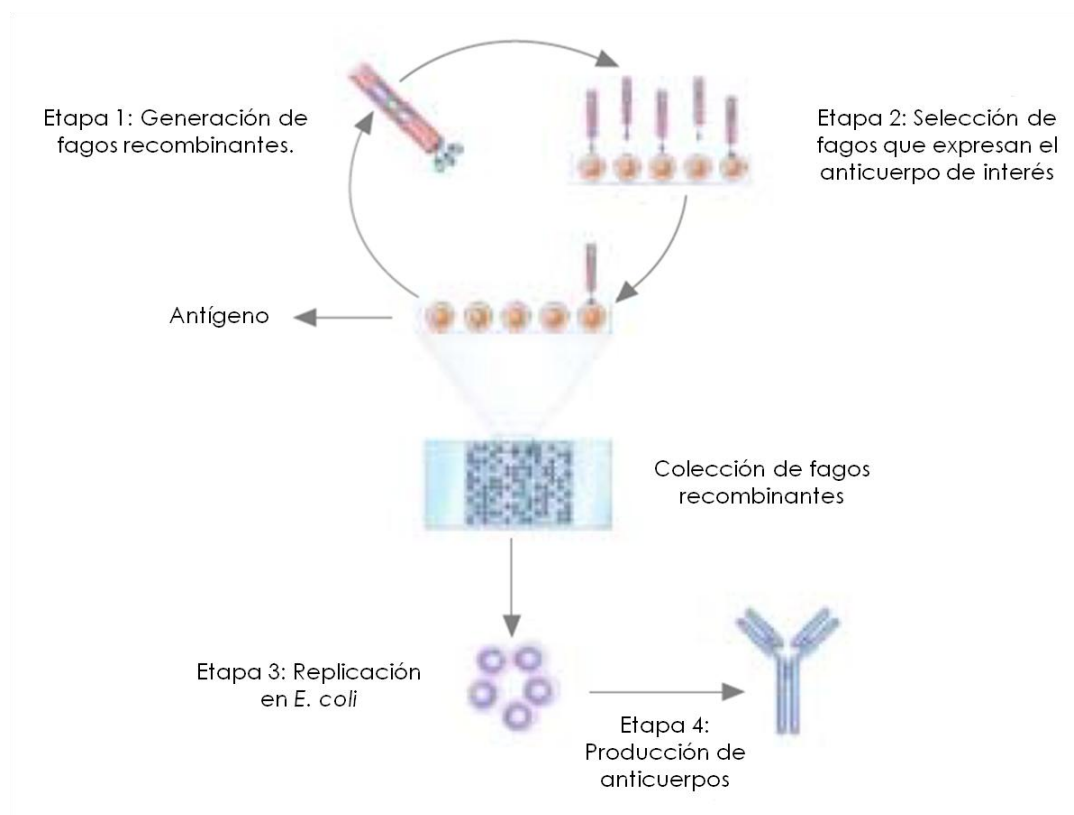
A mediados de los años noventa, con el desarrollo de la Biología Molecular, se obtuvieron distintos modelos de ratones transgénicos portadores de genes para la producción de inmunoglobulinas humanas. Dichos genes (transgenes) posibilitaron el desarrollo de una extensa batería de  $L_{\beta}$  productores de un amplio repertorio de anticuerpos humanos. Estos modelos animales pueden ser inmunizados con cualquier antígeno y sus bazo se pueden utilizar para la obtención de hibridomas mediante protocolos convencionales, aunque con mayores dificultades debido a su baja productividad.

### 1.3.2.2. Presentación de anticuerpos en superficie de fagos (*Phage-Display*).

Dada la dificultad para obtener hibridomas de anticuerpos humanos, se desarrollaron otras tecnologías alternativas para la producción de los mismos, incluyendo la producción de fragmentos de anticuerpos mediante la tecnología *Phage-Display* y su expresión en *Escherichia coli* u otras células (Figura 1.13.).

El fago M13 es un tipo de bacteriófago ampliamente empleado para la producción de anticuerpos monoclonales. Mediante técnicas de Ingeniería Genética, se producen fagos recombinantes que expresan en su cubierta la proteína codificada por el ADN insertado (ADN codificante para un anticuerpo). Cuando un fago recombinante infecta a una bacteria, se producen nuevos fagos que expresan en su superficie los anticuerpos de interés. Al ponerse en contacto con el antígeno conocido, los fagos portadores de anticuerpos en su cubierta son capaces de unirse al mismo, y así son seleccionados y empleados nuevamente para infectar nuevas bacterias con el fin de producir nuevos virus portadores de anticuerpos.

Normalmente, sólo se inserta el ADN correspondiente a los segmentos de los dominios variables de los anticuerpos que son los últimos responsables de la unión con su antígeno específico. Estos pequeños fragmentos de anticuerpos se denominan fragmentos variables de cadena única o scFv (*single-chain Fv*) (Smith, 2005).



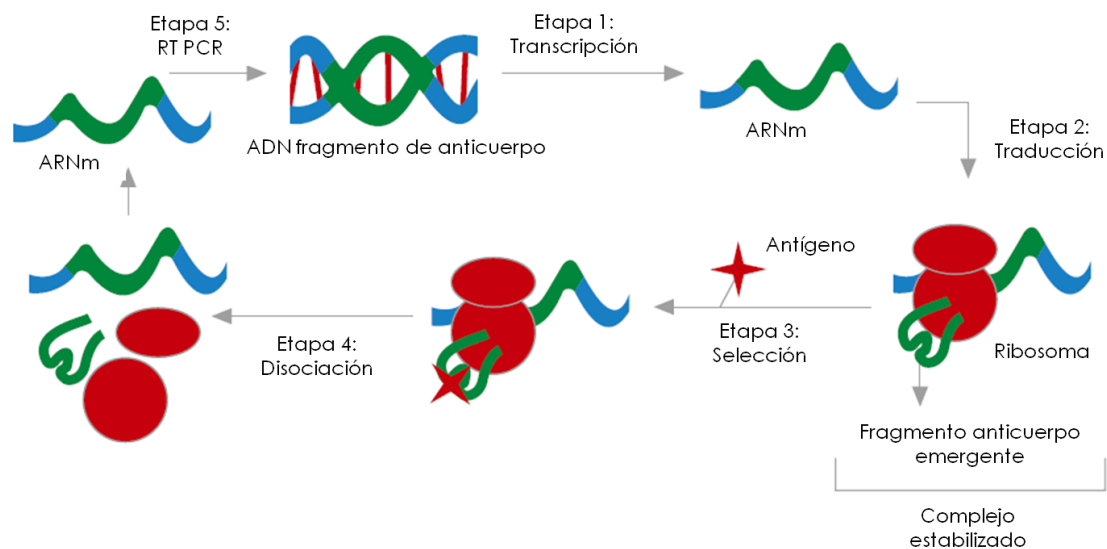
**Figura 1.13.** Tecnología de producción de anticuerpos mediante *Phage Display*. Modificado de (Brekke y Sandlie, 2003).



En la actualidad, para el empleo de esta tecnología, se utilizan fagómidos, es decir, vectores plasmídicos pequeños formados por una construcción genética artificial diseñada con el gen III del fago M13, secuencias necesarias para la infección correcta de *E. coli*, y un lugar concreto de inserción para la secuencia de ADN del anticuerpo de interés (Hoogenboom y col., 1991). Mediante esta tecnología, se han creado amplias colecciones de fragmentos de anticuerpos variables para numerosos antígenos (drogas, tóxicos, moléculas implicadas en el desarrollo del cáncer, enfermedades autoinmunes...) que se denominan bibliotecas de fragmentos de anticuerpos o genotecas de expresión de fagos (Janeway y col., 2000). Con estas bibliotecas de anticuerpos es posible generar anticuerpos completamente humanos para su uso terapéutico.

### 1.3.2.3. Tecnología del Ribosoma Display (*Ribosome Display*).

*Ribosome Display* es una tecnología de producción de fragmentos de anticuerpos monoclonales basada en su síntesis *in vitro* a través de los ribosomas, sin emplear células como "factorías" de producción de estas glicoproteínas (Figura 1.14.).



**Figura 1.14.** Generación de fragmentos de anticuerpos y bibliotecas mediante la tecnología Ribosoma Display. Modificado de [http://www.cambridgeantibody.com/home/drug\\_development/core\\_technologies/ribosome\\_display](http://www.cambridgeantibody.com/home/drug_development/core_technologies/ribosome_display).

Primero se aíslan los genes que codifican para los anticuerpos a partir de células humanas. Mediante la técnica de la PCR estos genes se copian, obteniendo gran cantidad de material genético de dichos anticuerpos. Posteriormente se procede a la transcripción del ADN obtenido, y las moléculas de ARN mensajero (ARNm) que se producen se incuban junto con ribosomas aislados (Ruiz y col., 2007). Gracias a la lectura que realizan los ribosomas del ARNm,

los fragmentos de los anticuerpos son sintetizados, formando un complejo ribosoma-ARNm-anticuerpo que se estabiliza *in vitro*. Al poner en contacto el complejo con la diana seleccionada, se aísla el anticuerpo que la reconoce específicamente. A partir del complejo y mediante la técnica RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa reversa), es posible obtener su secuencia génica para sucesivos clonajes.

El empleo de esta tecnología ofrece como ventaja que el sistema de producción de anticuerpos no depende del uso de células o fagos ni de las limitaciones que pudiesen surgir al emplear organismos vivos. Además, mediante este procedimiento es posible desarrollar multitud de complejos ribosoma-ARNm-anticuerpo, generando grandes colecciones o bibliotecas de anticuerpos al igual que se expone en la tecnología *Phage-Display*

#### **1.3.2.4. Nuevas estrategias para la producción de anticuerpos monoclonales.**

Una nueva vía en fase de investigación es la alternativa que ofrecen las plantas para la producción de anticuerpos monoclonales. La producción de anticuerpos, tanto en cultivos de células vegetales como en plantas, ofrecería ciertas ventajas como el aumento de productividad y la reducción de costes.

Actualmente existen varios estudios que utilizan diversas especies de plantas como "factorías" de producción de anticuerpos. Entre las especies empleadas se encuentran la planta del maíz, el arroz, la planta del tabaco, *Arabidopsis thaliana* y *Lemna minor*. A través de esta estrategia de producción se han conseguido producir diferentes proteínas terapéuticas, incluidos los anticuerpos (Fox, 2006) y fragmentos de anticuerpos recombinantes, que se encuentran en diferentes fases de desarrollo, algunos de ellos en la fase de ensayo clínico. Entre sus aplicaciones terapéuticas se pueden resaltar el tratamiento de algunos tipos de cáncer, infección por herpes y vacunación de animales (Ruiz Galán y col., 2005).

Investigaciones recientes han demostrado que el desarrollo de anticuerpos en la pequeña planta acuática *Lemna minor* ofrecería ciertas ventajas de producción, derivadas del bajo coste que ello supondría, así como una mejora en ciertas propiedades de los anticuerpos (Cox y col., 2006). Así mismo, ha sido posible producir en *Arabidopsis thaliana* (una especie de crucífera nativa de Europa y Asia) anticuerpos frente al virus de la hepatitis A tan efectivos como los obtenidos por otras técnicas (Van Droogenbroeck y col., 2007).

#### **1.3.2.5. Bibliotecas de anticuerpos.**

Gracias a la generación de grandes bibliotecas de anticuerpos, que contienen las secuencias de billones de fragmentos de anticuerpos humanos diferentes, se garantiza el aislamiento y la producción de los mismos para casi cualquier molécula diana (Ruiz y col., 2007).

La base del procedimiento de obtención de estas bibliotecas es la generación de múltiples fagos recombinantes que contengan una gran variabilidad en los genes de las inmunoglobulinas, más concretamente en las regiones variables, responsables del reconocimiento de epítomos de antígenos.

Las bibliotecas de fragmentos de anticuerpos pueden generarse de diversas formas, dando lugar a diferentes tipos de ellas, que se distinguen entre sí por la manera de obtener la secuencia génica, así como por su procedencia:

- En una biblioteca inmune, los genes de los anticuerpos deseados corresponden a anticuerpos generados en linfocitos B maduros que han sido expuestos al antígeno en un individuo inmunizado.
- Las bibliotecas *naive* contienen los genes de los anticuerpos deseados los cuales corresponden a linfocitos B que no han sido expuestos a antígeno, es decir, de un individuo no inmunizado.
- Por otro lado, en las bibliotecas sintéticas se encuentran genes con secuencias construidas artificialmente mediante ingeniería genética con oligonucleótidos sintéticos y que codifican para las regiones variables de los anticuerpos. En el caso de las bibliotecas semisintéticas los genes de los anticuerpos deseados corresponden a construcciones de secuencias de oligonucleótidos artificiales que codifican para regiones CDR (últimas responsables de la unión con el antígeno) y que mediante técnicas de ingeniería genética se han insertado en genes de las regiones variables de los anticuerpos.

### 1.3.3. TECNOLOGÍAS PARA LA MEJORA DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.

Un número considerable de péptidos y proteínas con actividad terapéutica presentan limitaciones en su uso debido a su alta toxicidad cuando se administran por vía sistémica, o bien a causa de la inactivación o degradación que experimentan una vez inoculados al paciente. Mediante técnicas de Biología Molecular, se puede lograr la conjugación de estas moléculas con anticuerpos, pudiéndose así paliar estos problemas al dirigirlas específicamente a su diana terapéutica, optimizando su efecto y su actividad (Mc Carron, 2005). En general, los anticuerpos monoclonales conjugados con otras moléculas resultan más efectivos como agentes terapéuticos, teniendo en cuenta que no todos los pacientes responden igual a este tipo de terapia (Sharkey y Goldenberg, 2006).

Una estrategia para aumentar la eficacia terapéutica de los anticuerpos monoclonales consiste en su unión con agentes tóxicos (que así disminuyen su toxicidad), formando las denominadas inmunotoxinas. El mecanismo de acción de las inmunotoxinas es debido a la localización que realiza el anticuerpo de su diana específica, su internalización y la posterior destrucción celular por acción de la toxina. El mayor efecto terapéutico para estas moléculas se

ha observado en el tratamiento de tumores hematológicos, aunque también se han detectado diversas limitaciones, como su elevado coste de producción y la respuesta inmune que se puede desencadenar en el organismo hacia las toxinas (Kreitman, 2006). No obstante las inmunotoxinas han logrado resultados prometedores en estudios realizados en laboratorio (Ruiz y col, 2007).

Mediante la estrategia denominada ADEPT (*Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy*) se reduce el riesgo de toxicidad sistémica. Ésta se basa en el uso de anticuerpos monoclonales conjugados con enzimas activadoras de determinadas toxinas o fármacos. A través de esta aproximación, los anticuerpos con especificidad para reconocer células tumorales se unen a ellas. Posteriormente se administra una pretoxina o un fármaco inactivo (profármaco) que se activa solamente en aquellas células cancerosas donde previamente se ha unido el anticuerpo-enzima (Sharkey y Goldenberg, 2006).

Otra nueva estrategia terapéutica consiste en la conjugación de anticuerpos monoclonales con isótopos radiactivos o radioisótopos. La aplicación más clara para este tipo de conjugados es el tratamiento del cáncer: mediante el reconocimiento que realiza el anticuerpo específico sobre las células tumorales, se intenta hacer llegar de forma selectiva la dosis de radiación terapéutica adecuada para su destrucción. Además se reduce el tiempo de circulación y la toxicidad sobre las células sanas del organismo. Para lograr la mayor eficiencia, se utilizan fragmentos de anticuerpos tales como los scFv o los Fab, que muestran menor tiempo de permanencia en sangre y, por tanto, evitan la continua exposición al radioisótopo por parte del resto de los órganos del cuerpo, aunque la actividad terapéutica en este sentido es menor que la que muestran los anticuerpos completos (Sharkey y Goldenberg, 2006).

Por otra parte, existen anticuerpos biespecíficos, que son inmunoglobulinas construidas artificialmente, en las cuales los dos sitios de unión que presenta el anticuerpo frente al antígeno poseen especificidades diferentes. Se han diseñado anticuerpos biespecíficos destinados a dirigir toxinas, radioisótopos, enzimas, antígenos, citoquinas y drogas citotóxicas. Este tipo de anticuerpos son prometedores en el campo de la oncología en combinación con la administración de radioisótopos. El anticuerpo reconoce por una parte la célula tumoral y por otra el isótopo radioactivo suministrado posteriormente. Ensayos preclínicos muestran que esta estrategia tiene un alto rendimiento (Sharkey y Goldenberg, 2006).

Así mismo, también existe un gran interés en el empleo de citoquinas conjugadas con anticuerpos (inmunocitoquinas) como agentes terapéuticos para el tratamiento de tumores.

#### **1.3.4. ANTICUERPOS MONOCLONALES TERAPÉUTICOS.**

Las características de los anticuerpos monoclonales hacen de ellos unos agentes terapéuticos prometedores ahora que, gracias a los avances experimentados en la Proteómica

y la Genómica, ha sido posible identificar y caracterizar nuevas moléculas diana que desempeñan funciones importantes en el desarrollo de ciertas enfermedades autoinmunes, víricas e incluso oncológicas. Así mismo, la mejora de las tecnologías de producción de anticuerpos monoclonales y fragmentos de dichos anticuerpos que permiten su producción a gran escala, hacen viable su utilización como productos farmacéuticos (Prete y col., 2005).

Hasta el desarrollo de los anticuerpos monoclonales en el año 1975, el uso de los anticuerpos en diagnóstico y/o terapia se centraba únicamente en la utilización de sueros inmunes convencionales. Como ya se ha mencionado con anterioridad, estos sueros policlonales obtenidos a partir de distintas especies animales contienen, entre otros muchos compuestos, una mezcla de anticuerpos producidos por distintos clones de linfocitos B activados (células plasmáticas). Estos anticuerpos reconocen en mayor o menor medida el antígeno, pero cada uno de ellos con distinta especificidad y afinidad cada uno de ellos. En cambio, los anticuerpos monoclonales los produce una única célula plasmática y sus clones son específicos de un solo epítipo (son monoespecíficos).

Debido a la especificidad de unión que poseen estos anticuerpos, se emplean en la localización y eliminación de patógenos infecciosos. También se utilizan como terapia en la detección de células concretas del organismo, como por ejemplo células tumorales, incluso en la inhibición de procesos inflamatorios. El efecto terapéutico de los anticuerpos monoclonales se debe por una parte a sus propiedades naturales como efectores de la respuesta inmune y por otra a que pueden tener efectos derivados de la naturaleza de la diana, bloqueando la actividad de moléculas como las citoquinas o factores de crecimiento, o como ya se ha comentado anteriormente, empleándose como transportadores de fármacos, toxinas, enzimas o isótopos.

Desde que en Estados Unidos la FDA (*Food and Drug Administration*) aprobó en 1986 el primer anticuerpo monoclonal para el tratamiento del rechazo del trasplante de riñón (Colvin y Preffer, 1991), estos han sido empleados en terapia para el tratamiento de otras diversas enfermedades. Los anticuerpos monoclonales aprobados hasta la fecha tienen aplicaciones en áreas diversas como el cáncer, las enfermedades autoinmunes e inflamatorias crónicas y el tratamiento del rechazo en los trasplantes. Actualmente, existe un elevado número de anticuerpos monoclonales terapéuticos en diferentes fases de desarrollo e investigación. En general, las dianas terapéuticas reconocidas por estos anticuerpos son virus, células tumorales, citoquinas, factores de crecimiento u otros anticuerpos responsables de enfermedades autoinmunes.

Las enfermedades autoinmunes son consecuencia de una respuesta incorrecta del sistema inmune hacia los propios tejidos. Existen diferentes patologías autoinmunes que son susceptibles de tratamiento con anticuerpos monoclonales como la artritis reumatoide, la psoriasis, la enfermedad de Crohn o la esclerosis múltiple.

Los anticuerpos monoclonales también se utilizan en el tratamiento de enfermedades pulmonares como el asma alérgica persistente y en la profilaxis de la enfermedad infecciosa causada por el virus respiratorio sincitial (SRV) en niños. También se están desarrollando anticuerpos monoclonales para el tratamiento de otras infecciones por virus como el de la hepatitis B, la infección respiratoria por el metapneumovirus, la hepatitis C, el virus de la inmunodeficiencia humana adquirida (VIH) y el virus del papiloma humano, así como para el tratamiento y la prevención del ántrax.

El mayor número de anticuerpos monoclonales comercializados actualmente se utilizan en la terapia contra el cáncer gracias a la identificación de numerosos antígenos que se sobreexpresan en las células tumorales y que sirven como diana terapéuticas. Los anticuerpos monoclonales se utilizan combinados con quimioterapia y radioterapia para aumentar su efecto antitumoral. Actualmente existe terapia con anticuerpos monoclonales para el tratamiento de enfermedades malignas de tipo hematológico y tumores sólidos como los de colon y mama.

En el trasplante de órganos es necesario regular el sistema inmune del receptor con la finalidad de prevenir y tratar el rechazo del órgano donado y detectado como "extraño". Para evitar esta respuesta la estrategia terapéutica más común consiste en inmunodeprimir al receptor mediante fármacos inmunodepresores y mediante anticuerpos que reconocen específicamente los distintos receptores en la membrana de los linfocitos implicados en la respuesta inmune, atenuando su acción en el rechazo. Existen en el mercado anticuerpos monoclonales para la inmunomodulación en el trasplante de riñón, hígado y corazón.

Finalmente, también se utilizan anticuerpos monoclonales para la prevención de la isquemia cardíaca debida a la formación de trombos en intervenciones coronarias, para el tratamiento de la degeneración macular y enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o la distrofia muscular.



## 2. OBJETIVOS.

La nosemosis es una enfermedad común que afecta a las abejas de todo el mundo y que está causada por los microsporidios *Nosema apis* y *Nosema ceranae*. En España, esta última especie resulta más patogénica que *N. apis* cuando parasita a *Apis mellifera* (la abeja de la miel europea), con el agravante de que las abejas infectadas con *N. ceranae* no presentan signos clínicos externos de enfermedad. La presencia de *N. ceranae* se ha relacionado con los colapsos de colmenas sucedidos en Europa y se considera a esta especie como uno de los posibles agentes causantes del Síndrome de Despoblamiento de las Colmenas. Estos antecedentes ponen de manifiesto la importancia del desarrollo de técnicas de detección que permitan el diagnóstico diferencial de las dos especies de *N. apis* y *N. ceranae* de una manera efectiva y rápida.

La morfología de las esporas de *N. apis* y *N. ceranae* es muy similar, y su diferenciación resulta difícil incluso para el personal experimentado. Habitualmente su diagnóstico se realiza mediante técnicas moleculares como la PCR múltiple, que permiten su diferenciación. Sin embargo, esta técnica resulta cara y poco accesible para muchos laboratorios, por lo que el objetivo principal de este trabajo se basa en la obtención y caracterización de anticuerpos monoclonales frente a *N. ceranae* y *N. apis*, que permitan el desarrollo de técnicas de diagnóstico rápidas, específicas y sensibles que sirvan para identificar la presencia de sus esporas en muestras de colmenas mediante IFI. Además de su aplicación diagnóstica, dichos anticuerpos monoclonales, mediante su utilización en técnicas como ELISA, Western Blot y MET, podrán servir como herramientas para la caracterización de antígenos destinados a la búsqueda de dianas terapéuticas que permitan instaurar estrategias farmacológicas más adecuadas para el tratamiento de estos parásitos.

Por tanto, se proponen los siguientes objetivos concretos:

- Obtención y caracterización de anticuerpos monoclonales múridos frente a *N. apis* y *N. ceranae*, específicos de género y de especie, aplicables para el diagnóstico de las nosemosis en las abejas de la miel (*Apis mellifera*).
- Desarrollo de una técnica de IFI para la detección y el diagnóstico diferencial de los microsporidios *N. apis* y *N. ceranae*, utilizando los anticuerpos monoclonales previamente obtenidos y caracterizados en el laboratorio.
- Validación de la técnica de IFI mediante un estudio comparativo con otras técnicas de diagnóstico utilizadas actualmente (microscopio de contraste de fases y PCR *Multiplex*) en el Centro Ápícola Regional de Marchamalo (Castilla La Mancha), laboratorio de referencia para la identificación de estas especies de microsporidio en España.





### 3. MATERIAL Y MÉTODOS.

#### 3.1. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES FRENTE A *N. ceranae* Y *N. apis*.

##### 3.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO.

Para la realización de los distintos estudios llevados a cabo en este trabajo se utilizó el siguiente material biológico:

###### 3.1.1.1. Esporas.

Se utilizaron esporas de *Nosema ceranae* y *Nosema apis* suministradas por el Centro Apícola Regional de Castilla La Mancha, España (CAR). Estas esporas se aislaron en dicho centro a partir de colmenas de abejas (*Apis mellifera*) infectadas por estos dos parásitos, tanto de forma natural como experimental. Para su obtención se diseccionó el tracto intestinal de las abejas infectadas, que se trituró y se maceró en agua destilada. La identificación de ambas especies se realizó utilizando microscopía en contraste de fases y/o PCR múltiple (Martin-Hernandez y col., 2007). Dichas esporas se purificaron y trataron (apartado 3.1.2.1.) para la posterior inmunización del modelo animal.

Para el estudio de reacciones cruzadas se utilizaron además otras esporas de distintas procedencias: las esporas de *Enterocytozoon bieneusi* se aislaron en las muestras fecales de un paciente inmunocomprometido (del Águila y col., 1997). Las de *Encephalitozoon cuniculi* pertenecen a la cepa USP A1 aislada en el laboratorio de parasitología de la Universidad San Pablo-CEU. Así mismo se utilizaron la cepa CDCV297 de *Encephalitozoon intestinalis* y la cepa CDCV257 de *Encephalitozoon hellem*. Las de *Ancaliia algerae* fueron suministradas por la Dra. Elizabeth S. Didier, del *Tulane National Primate Research* de Nueva Orleans. Por último, las esporas de *Vittaforma corneae* fueron cedidas por el Dr. Visvesvara, Centers for Disease Control and Prevention (CDC, Atlanta, EE.UU.).

###### 3.1.1.2. Modelo animal.

Para la obtención de anticuerpos policlonaes se utilizaron como modelo animal hembras de conejo de la raza Nueva Zelanda de 2 – 2,25 kg de peso, mantenidas en animalario en condiciones de aislamiento.

### 3.1.1.3. Muestras de colmenas.

Con el objetivo de validar el método de IFI para el diagnóstico de *N. ceranae* empleando el anticuerpo policlonal obtenido frente a *N. ceranae*, se realizó un estudio ciego sobre un total de 180 muestras procedentes del Centro Apícola Regional (CAR). Cada muestra estaba constituida por un homogenizado de abejas de la colmena correspondiente. Se utilizaron colmenas infectadas con *N. ceranae*, con *N. apis*, coinfectadas con las dos especies simultáneamente y libres de infección, las cuales sirvieron como control negativo del estudio. En todas las muestras se había estudiado previamente la presencia o ausencia de *N. ceranae* y *N. apis* mediante microscopía óptica con contraste de fases y mediante técnicas moleculares (PCR múltiple).

### 3.1.2. MÉTODOS.

#### 3.1.2.1. Purificación y tratamiento de las esporas.

Para la selección de las esporas de entre el resto de los componentes presentes en los macerados de abejas infectadas que se recibieron en el laboratorio (apartado 3.1.1.1.), éstos se sometieron a un proceso de purificación en Percoll (Sigma Cat. nº P4937). Para ello, cada macerado se lavó en PBS 1x centrifugando a 2500 rpm durante 15 minutos.

##### a) Tamizado.

En los casos en los que fue necesario, el macerado se pasó por un tamiz con una luz de malla de 10 µm y con ayuda de PBS 1x, para retirar la mayor cantidad de residuos posible. Se realizó un recuento de las esporas del tamizado en cámara de *Neubauer*. Las diluciones para el recuento se realizaron en Azul Tripán al 0,4 % (Sigma Cat. nº T8154). El resto de macerado retenido por el tamiz se recogió en tubos aparte y se almacenó a 4 °C por contener algunas esporas.

##### b) Purificación.

El macerado (tamizado o no), se concentró en 2 ml de PBS 1x mediante su centrifugación (2500 rpm, 15 minutos) y posterior resuspensión. A continuación se dispuso sobre una fase de 40 ml de Percoll isotónico al 95 % en PBS 1x con cuidado de no romper la interfase. Se centrifugó a 15000 g (11000 rpm) durante 45 minutos sin freno. Una vez centrifugadas, las

esporas en una banda próxima al fondo del tubo, se recogieron con una pipeta *Pasteur*. Para retirar el Percoll que hubiera podido quedar entre ellas, se lavaron tres veces en PBS 1x. En algunos casos parte de las esporas pueden quedar en la fase superior de Percoll, por lo que ésta fase no se eliminó sino que se separó en otro tubo que se almacenó a 4°C para su examen.

### c) Tratamiento.

Las esporas limpias se resuspendieron en un tampón de tratamiento (1000 UI/ml de Penicilina/Estreptomicina; 100 µg/ml de Gentamicina y 12,5 µg/ml de Anfotericina B diluidos en PBS 1x) en el que se mantuvieron a 37 °C durante 48 horas, cambiando el tampón a las 24 horas y agitando con vortex dos veces al día. Pasados los dos días las esporas se pasaron a un tampón de mantenimiento (100 UI/ml de Penicilina/Estreptomicina; 5 µg/ml de Gentamicina y 1 µg/ml de Anfotericina B diluidos en PBS 1x) y se almacenaron a 4 °C hasta su uso. Se realizó un nuevo recuento de las esporas en la muestra resultante, para calcular su concentración final y el rendimiento de la purificación.

Una vez purificadas y tratadas, las esporas se utilizaron en los distintos protocolos llevados a cabo en este estudio: inmunización del modelo animal (apartado 3.1.2.2.) y titulación de sueros policlonales (apartado 3.1.2.4.).

#### 3.1.2.2. Protocolos de inmunización y sangrado del modelo animal.

Las esporas purificadas y tratadas se inocularon en la vena marginal de la oreja de los conejos Nueva Zelanda. La dosis inicial fue de  $10^7$  esporas suspendidas en 1 ml de PBS estéril/conejo, realizando en los días sucesivos dosis de recuerdo de la misma concentración (Tablas 3.1. y 3.2.).

Así mismo, las pautas de sangrado para la obtención de suero policlonal se realizaron el día 0 (el del primer inóculo) y en los días sucesivos durante los que se llevó a cabo la inmunización, obteniendo en cada uno de 20 a 30 ml de sangre (Tablas 3.1. y 3.2.). La última sangría consistió en un sangrado a muerte del animal vía cardiaca, previa administración de anestesia (dosis intravenosa de 3 mg/kg de xilacina y 10 mg/kg de ketamina), obteniendo unos 40 ml de sangre por conejo.

Se utilizaron dos lotes distintos de animales inmunizados con *N. apis* y *N. ceranae*, siguiendo el calendario de inmunización y sangrado que se muestra en las Tablas 3.1. y 3.2.

En el caso de los conejos inoculados con esporas de *N. apis* (Lote nº2, Tabla 3.2.), se suspendió la inmunización en el segundo inóculo, ya que estudios simultáneos mostraron reacción cruzada con *N. ceranae* (apartado 4.1.1.3.a., Tablas 4.4. y 4.5.).

**Tabla 3.1.1.** Protocolo de inmunización de los conejos inoculados con esporas de *N. ceranae* (Lote nº 1:).

		INOCULACIÓN/SANGRÍA						
		nº 0	nº 1	nº 2	nº 3	nº 4	nº 5	nº 6
Conejo 1	Día postinóculo	0	29	44	71	116	161	203
	Día Sangría	0	21	63	153	181	223	NR
Conejo 2	Día postinóculo	0	18	63	105	148	237	NR
	Día Sangría	0	55	83	124	259	286	NR

NR = No realizado.

**Tabla 3.1.2.** Protocolo de inmunización de los conejos inoculados con esporas de *N. apis* (Lote nº 2).

		INOCULACIÓN/SANGRÍA						
		nº 0	nº 1	nº 2	nº 3	nº 4	nº 5	nº 6
Conejo 3	Día postinóculo	0	25	NR	NR	NR	NR	NR
	Día Sangría	0	48	NR	NR	NR	NR	NR
Conejo 4	Día postinóculo	0	25	NR	NR	NR	NR	NR
	Día Sangría	0	48	NR	NR	NR	NR	NR

NR = No realizado.

Todos los protocolos de inmunización y sangrado se llevaron a cabo en el Servicio de animalario y Cirugía Experimental de la facultad de Farmacia de la Universidad San Pablo-CEU (SVA-USP-CEU nº de Registro Europeo: ES 280220000015) y siguiendo las normas establecidas por el Real Decreto 1201/2005 de 10 de octubre que transcribe la Directiva europea 86/609/CEE.

### 3.1.2.3. Procesado de la sangre para la obtención del suero policlonal.

Para la obtención de los sueros policlonales la sangre extraída al lote de animales inmunizados se dejó reposar unas horas a 4 °C y, una vez formado el coágulo, se centrifugó a 2500 rpm durante 30 minutos a 4 °C. El suero se separó con micropipeta y se fraccionó, almacenándose a -20 °C para su posterior análisis.

### 3.1.2.4. Titulación de los sueros policlonales.

Con el fin de observar la evolución en la producción de anticuerpos, después de cada sangría y antes de la siguiente inmunización (Tablas 3.1. y 3.2.), los sueros policlonales obtenidos

se fueron titulando mediante la técnica de IFI. Todos los sueros se titularon tanto frente a *N. apis* como a *N. ceranae* para detectar posibles reacciones cruzadas entre ambas especies.

#### **a) IFI para la titulación de los sueros policlonales.**

La técnica de IFI se realizó siguiendo el método descrito por Visvesvara y col. en 1995, con algunas modificaciones (Visvesvara y col., 1995).

Se tapizaron portaobjetos de 10 pocillos (Biomérieux Cat. nº 75 751) con 5 µl/pocillo de una suspensión de esporas control de *N. ceranae* para las titulaciones, o de *N. apis* para el control de las posibles reacciones cruzadas, a una concentración de  $10^7$  esporas/ml. Los portas, una vez secos a temperatura ambiente, se fijaron en metanol-acetona (1:1) durante un tiempo mínimo de 10 minutos. Pasado este tiempo se dejaron secar de nuevo a temperatura ambiente y se conservaron a -20 °C.

Sobre los portaobjetos previamente tapizados, se añadieron 20 µl/pocillo de distintas diluciones de los sueros policlonales obtenidos en las sangrías. Estas diluciones se realizaron por duplicado, partiendo de la dilución 1/100 hasta la 1/12800 y utilizando PBS 1x como diluyente. Se incubaron en una cámara húmeda a 37 °C durante 30 minutos. Pasado este tiempo se retiró el suero de los portaobjetos mediante tres lavados de 10 minutos, con agua destilada y agitación suave.

Una vez que los portas se secaron a temperatura ambiente, se añadieron 20 µl/pocillo del anticuerpo secundario anti-conejo marcado con isocianato de fluoresceína (Sigma Cat. nº F-9887) diluido 1/800 con Azul de Evans al 0,2 % en PBS 1x. La incubación del conjugado, así como los lavados de los portas, se realizaron en las mismas condiciones que el anticuerpo primario (los sueros policlonales), aunque en éste caso todos los pasos se realizaron en oscuridad.

Los portaobjetos se montaron con PVA (Alcohol Polivinílico) y se leyeron en oscuridad en el microscopio de fluorescencia con luz UV (excitación a 490 nm y emisión a 514 nm de longitud de onda).

#### **3.1.2.5. Estudio de reacciones cruzadas de los sueros policlonales.**

##### **a) IFI para el estudio de reacciones cruzadas frente a la especie heteróloga de *Nosema*.**

De manera simultánea a las titulaciones de los sueros obtenidos, se realizó un estudio de reacciones cruzadas frente a los dos parásitos de *Nosema* que se encuentran en las abejas. Así, los sueros de los conejos inoculados con *N. apis* se probaron frente a *N. ceranae* y los de los conejos inmunizados con *N. ceranae*, frente a *N. apis*.

El procedimiento llevado a cabo fue el mismo que se ha descrito para la titulación de los sueros policlonales (apartado 3.1.2.4.a.).

#### **b) IFI para el estudio de reacciones cruzadas frente a otros géneros de microsporidios.**

Una vez determinado el título de los sueros policlonales, se realizó un estudio de reacciones cruzadas frente a otras especies de microsporidios mediante IFI.

Los portaobjetos se tapizaron con 5 µl/pocillo de una suspensión de esporas de *Encephalitozoon intestinalis*, *Encephalitozoon cuniculi*, *Encephalitozoon hellem*, *Enterocytozoon bieneusi*, *Vittaforma corneae* o *Ancaliia algerae*. La concentración de tapizado fue de 10<sup>7</sup> esporas/ml. Los métodos de fijación y almacenaje de los portaobjetos tapizados fueron los mismos que se han descrito en el apartado 3.1.2.4.a.

Como anticuerpo primario se añadieron las diluciones del suero policlonal obtenido. En este caso se utilizó el suero procedente de la última sangría del Conejo 1. Se emplearon las diluciones 1/800, 1/1600, 1/2000 y 1/2400 previamente elegidas en la titulación del mismo (apartado 4.1.1.2., Tabla 4.2.).

Salvo estas excepciones, la metodología llevada a cabo para la realización de la inmunofluorescencia fue la misma que la descrita con anterioridad en el apartado 3.1.2.4.a.

#### **3.1.2.6. Diagnóstico de *N. ceranae* utilizando los anticuerpos policlonales.**

Con el fin de validar el método de IFI para el diagnóstico de *N. ceranae* empleando el anticuerpo policlonal frente a *N. ceranae*, ésta técnica se utilizó sobre un total de 180 muestras procedentes del Centro Apícola Regional (CAR). En todas las muestras se había estudiado previamente la presencia o ausencia de *N. ceranae* y *N. apis* mediante microscopía óptica con contraste de fases y mediante técnicas moleculares (PCR múltiple) como se ha indicado en el apartado 3.1.1.3.

#### **a) Tratamiento de las muestras de colmenas.**

Con el fin de garantizar muestras con una concentración de esporas adecuada para el tapizado de los portaobjetos y libres de residuos y artefactos que pudieran interferir la lectura de la IFI, las partes alícuotas de los homogeneizados se observaron en el microscopio óptico para determinar la cantidad de esporas que contenían, así como para detectar la presencia o ausencia y la cantidad de residuos tales como polen, restos de abeja, etc. Las esporas con muchos residuos y una elevada carga de esporas se diluyeron 1/2 con formalina. En las muestras

con una baja carga de esporas, se procedió a la separación de los residuos por sedimentación de los mismos. Las muestras que no presentaron apenas residuos se utilizaron directamente (sin diluir) para el tapizado de los portaobjetos. Las partes alícuotas procesadas para su utilización en los tapizados se almacenaron a 4 °C mientras que las directamente procedentes de los homogeneizados se mantuvieron congeladas a -20 °C.

#### **b) IFI para el diagnóstico de *N. ceranae* utilizando los anticuerpos policlonales.**

Para llevar a cabo este estudio, los portaobjetos se tapizaron con las 180 muestras de colmenas previamente procesadas (apartado 3.1.1.3.). En cada uno de los portaobjetos además se tapizaron pocillos con esporas purificadas de *N. ceranae* y *N. apis* que sirvieron como control positivo y negativo. Para la fijación y la conservación de los portaobjetos tapizados se emplearon los métodos descritos anteriormente (apartado 3.1.2.4.a.). Para la realización de la técnica de inmunofluorescencia indirecta se siguió la misma metodología descrita en dicho apartado utilizando como primario 20 µl/pocillo del anticuerpo policlonal anti-*N. ceranae* (última sangría del Conejo 1) diluido en PBS 1x a la 1/1600.

#### **3.1.2.7. Análisis estadístico de los resultados.**

Se compararon los resultados obtenidos de las 180 colmenas mediante la técnica de IFI desarrollada con el anticuerpo policlonal anti-*N. ceranae*, con los resultados obtenidos y facilitados por el CAR, mediante microscopía de contraste de fases, así como con la técnica de biología molecular de la PCR múltiple (Martin-Hernandez y col., 2007).

Como base del análisis estadístico se utilizó el programa EPIDAT 3.1 (Vidal y col., 2004), con el que se realizó un Test Diagnóstico para poder comparar la sensibilidad y la especificidad de nuestra técnica de IFI con respecto a las otras dos técnicas. La técnica de PCR, utilizada como técnica de rutina en el CAR (centro de referencia para el diagnóstico de estos parásitos en España), se consideró como patrón de oro.

Como complemento al test diagnóstico y para dar una mayor robustez al estudio estadístico se realizó en paralelo un análisis de concordancia de los resultados obtenidos por las distintas técnicas, utilizando el método estadístico Kappa de Cohen, que fue interpretado según la escala elaborada por Altman (Altman, 1991). Así mismo, se llevó a cabo una comparación de proporciones mediante el método de *Chi* cuadrado. Ambos análisis se ejecutaron con el programa estadístico PASW 18 (IBM SPSS).



### **3.2. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A *N. ceranae*.**

#### **3.2.1. MATERIAL BIOLÓGICO.**

Para la obtención de los anticuerpos monoclonales objeto de este estudio se utilizó el siguiente material biológico:

##### **3.2.1.1. Esporas.**

Se utilizaron las esporas de *Nosema ceranae* y *Nosema apis* provistas por el CAR (Centro Apícola Regional de Castilla La Mancha, España), que fueron obtenidas e identificadas según la metodología descrita previamente en el apartado 3.1.1.1.

Una vez en el laboratorio, dichas esporas se purificaron y trataron (apartado 3.1.2.1.) para su utilización en los distintos protocolos llevados a cabo en este estudio (obtención de antígeno soluble, inmunización del modelo animal, selección de híbridos productores y titulaciones de sueros, sobrenadantes saturados y ascitis).

##### **3.2.1.2. Líneas celulares.**

En la fusión celular (mieloma-linfocito) se utilizó la línea de mieloma P3X63-Ag8.653, obtenida de plasmacitoma de ratones (*Mus musculus*) de la cepa BALB/c. Esta línea celular se caracteriza por su sensibilidad al medio HAT y por no secretar inmunoglobulinas (Kearney y col., 1979).

##### **3.2.1.3. Modelo animal.**

En todos los protocolos para la obtención de anticuerpos monoclonales se utilizaron como modelo animal hembras de ratón de la cepa BALB/c (Harlan Interfauna Ibérica, S.L.). Se eligió esta cepa porque presenta una elevada histocompatibilidad con la línea de mieloma que se utilizó tanto para las fusiones celulares (apartado 3.2.2.3.b.) como para la producción de ascitis (apartado 3.2.2.4.). Los animales se mantuvieron en condiciones de aislamiento en el Servicio de animalario y Cirugía Experimental de la Facultad de Farmacia de la Universidad San Pablo-CEU (SVA-USP-CEU nº de Registro Europeo: ES 280220000015) y siguiendo las normas establecidas por el Real Decreto 1201/2005 de 10 de octubre que transcribe la Directiva europea 86/609/CEE.

En primer lugar, para la obtención de anticuerpos monoclonales *in vitro* (apartado 3.2.2.3.), se inmunizó un lote de animales formado por 10 hembras BALB/cOlaHsd de siete semanas de edad.

En el caso de la obtención de timocitos (apartado 3.2.2.3.b.2.) como medio de expansión de clones (*feeder layer*), dado que el órgano del timo sufre una regresión a lo largo de la vida del animal, se emplearon animales más jóvenes (3 semanas de edad).

Así mismo, para la producción de anticuerpos monoclonales *in vivo* (obtención de líquido ascítico) se emplearon hembras BALB/c de 6 a 8 semanas de edad en lotes de 6 animales por cada hibridoma obtenido (apartado 3.2.2.4.).

### **3.2.2. MÉTODOS.**

#### **3.2.2.1. Purificación y tratamiento de las esporas.**

Antes de su utilización, las muestras de esporas recibidas del CAR se sometieron a procesos de tamizado, purificación en percoll y tratamiento con antibióticos, siguiendo los mismos protocolos descritos previamente en el apartado 3.1.2.1.

#### **3.2.2.2. Obtención de antígeno soluble de espora.**

Se intentó poner a punto una prueba de ELISA para la selección de los híbridos secretores producidos en la fusión (apartado 3.2.2.3.b.4.1.1.). Para ello, se obtuvo antígeno soluble de espora siguiendo el método descrito por del Águila (del Águila y col., 2001a). Después de una centrifugación a 13000 rpm durante 1 minuto, al sedimento de esporas obtenido se le añadieron 0,5 g de perlas de vidrio de 425-600 micras (Sigma Cat. nº G-8772) suspendidas en un solución de lisis compuesta por SDS al 2,5 % (Bio-Rad Cat. nº 161-0302), 2-mercaptoetanol al 10 % (Bio-Rad Cat. nº 161-0710) y agua Mili-Q (c.s.p. 600 µl). La suspensión se agitó en un homogeneizador FastPrep®-24 (MP Biomedicals Cat. nº 6004500) durante 45 segundos a la velocidad máxima (6,5 m/s). Este proceso se repitió hasta cinco veces dejando enfriar en baño de hielo durante diez minutos cada vez.

Para bajar la espuma producida por la agitación, se centrifugó a 13000 rpm durante cinco minutos. El sobrenadante se pasó a un tubo limpio y se dializó frente a PBS 1x durante 48 horas a 4 °C y en agitación, utilizando una membrana de diálisis VISKING® *dialysis tubing* 27/32 (Serva Cat. nº 44114). Durante la diálisis se fue añadiendo nuevo tampón para evitar que la membrana de diálisis se deshidratara y éste se renovó por completo a las 24 horas. Finalizada la diálisis se hicieron alícuotas del antígeno soluble y se conservaron a -20 °C hasta su utilización.

### a) Valoración de la concentración de proteínas.

La determinación de la concentración de proteínas en el antígeno soluble se realizó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Para constituir la curva patrón se utilizaron distintas concentraciones (1, 5, 10, 15, 20 y 25 µg/ml) de Albúmina Sérica Bovina (BSA), obtenidas al diluir un estándar de concentración conocida en PBS 1x. Además se incluyó un blanco que solo contenía el diluyente. A continuación, a cada concentración se le añadió el reactivo colorante comercial (Sigma Cat. nº B-6916) y se midieron las distintas Densidades Ópticas (DO) a 595 nm de longitud de onda ( $\lambda$ ), de menor a mayor concentración. Al realizar el mismo ensayo con distintas diluciones de antígeno soluble se obtuvieron las DO que se interpolaron en la curva patrón previamente calculada.

### 3.2.2.3. Obtención de anticuerpos monoclonales *in vitro*.

#### a) Protocolos de inmunización y sangrado del modelo animal.

Los protocolos de inmunización y sangrado se llevaron a cabo en el Servicio de animalario y Cirugía Experimental de la facultad de Farmacia de la Universidad San Pablo-CEU (SVA-USP-CEU nº de Registro Europeo: ES 280220000015) y siguiendo las normas establecidas por el Real Decreto 1201/2005 de 10 de octubre que transcribe la Directiva europea 86/609/CEE.

Los inóculos se prepararon con esporas de *N. ceranae* purificadas, tratadas y contadas (apartado 3.1.2.1.), que se sometieron a 2 lavados sucesivos por centrifugación a 2500 rpm durante 15 minutos a 4 °C, y posterior resuspensión en PBS 1x.

La suspensión de esporas se inoculó vía intraperitoneal utilizando agujas 23G en un lote de diez ratones hembra de BALB/c. Dado que no pudieron establecerse cultivos de las esporas de *N. ceranae*, la cantidad de esporas inoculadas fue variable en función de la disponibilidad de las mismas. Los inóculos administrados para la inmunización de los ratones que se emplearon en la fusión celular se muestran a continuación en la Tabla 3.3.

**Tabla 3.2.1.** Inóculos de esporas de *N. ceranae* administrados al lote de ratones.

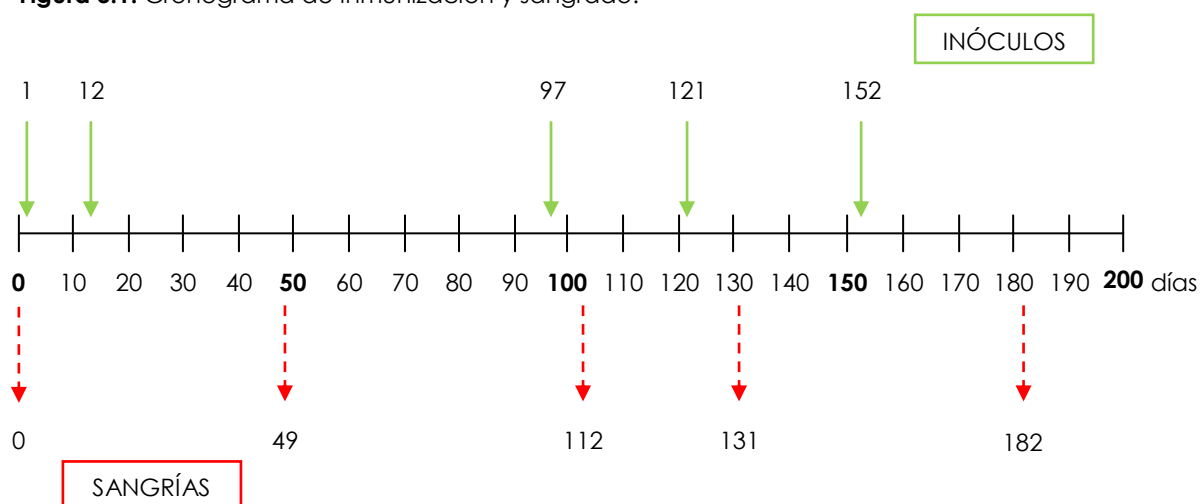
<b>INÓCULO 1</b>	4,5 x 10 <sup>8</sup> esporas totales	4,5 x 10 <sup>7</sup> esporas/ratón
<b>INÓCULO 2</b>	5,8 x 10 <sup>7</sup> esporas totales	5,8 x 10 <sup>6</sup> esporas/ratón
<b>INÓCULO 3</b>	6,6 x 10 <sup>7</sup> esporas totales	6,6 x 10 <sup>6</sup> esporas/ratón
<b>INÓCULO 4</b>	2,5 x 10 <sup>8</sup> esporas totales	2,5 x 10 <sup>7</sup> esporas/ratón
<b>INÓCULO 5</b>	2,5 x 10 <sup>8</sup> esporas totales	2,5 x 10 <sup>7</sup> esporas/ratón

Una vez finalizado el protocolo de inmunización, con el fin de mantener elevado el título de anticuerpos, se administraron dosis sucesivas de recuerdo de  $2.10^7$  esporas/ratón a distintos tiempos (en función de la disponibilidad de esporas). Además 3 ó 4 días antes de la fusión se inoculó una última dosis como recuerdo.

Previo al protocolo de inmunización, se realizó una sangría a día 0 con el fin de obtener suero negativo que sirviera como control en estudios posteriores. Así mismo, durante los días sucesivos en los que se llevó a cabo la inmunización, se realizaron sangrías obteniendo en cada una de 150 a 400 µl de sangre para todo el lote de ratones. En todos los casos las sangrías se realizaron vía safena utilizando viales capilares Microvette® CB 300 (Sarstedt Cat. nº 16.440).

El cronograma de las inoculaciones y sangrías realizadas se muestra en la Figura 3.1.:

**Figura 3.1.** Cronograma de inmunización y sangrado.



#### **a.1) Procesado de la sangre para la obtención del suero policlonal.**

Para la obtención de los sueros policlonales, la sangre extraída al lote de animales inmunizados se dejó reposar unas horas a 4 °C, y una vez formado el coágulo, se centrifugó a 2500 rpm durante 30 minutos a 4 °C. El suero se separó con micropipeta y se fraccionó en distintas alícuotas que se almacenaron a -20 °C para su posterior análisis.

#### **a.2) Titulación de los sueros policlonales.**

A lo largo del protocolo de inmunización se estudió la evolución de los títulos de los anticuerpos en cada uno de los días de sangría. Para ello se utilizó la técnica de

inmunofluorescencia indirecta (IFI). Todos los sueros se titularon tanto frente a *N. apis* como a *N. ceranae*, para detectar posibles reacciones cruzadas entre ambas especies.

#### **a.2.1) IFI para la titulación de los sueros policlonales.**

El protocolo de IFI que se utilizó fue la modificación de Visvesvara (1995) que se ha descrito con anterioridad en el apartado 3.1.2.4.a., con la salvedad de que, en este caso, se realizaron diluciones dobles seriadas de los sueros policlonales, que partieron de la 1/25 hasta la 1/3200, y como anticuerpo secundario se utilizó un conjugado anti ratón marcado con isocianato de fluoresceína (Sigma Cat. nº F2012) diluido 1/300 con Azul de Evans al 0,2 % en PBS 1x.

### **b) Protocolo de fusión celular.**

#### **b.1) Crecimiento y mantenimiento del mieloma.**

La línea de mieloma P3X63-Ag8.653 se mantuvo en fase de crecimiento exponencial constante en frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> (Corning Cat. nº 3056) en estufa a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>, con medio completo: RPMI 1640 (Sigma Cat. nº R-0883) suplementado con L-Glutamina (Sigma Cat. nº 68540) 2 mM y un 18 % de suero bovino fetal (SBF) (Linus Cat. nº S01805) previamente inactivado (96 °C durante 45 - 60 minutos).

#### **b.2) Obtención de timocitos como medio de expansión de clones.**

La capa de alimentación (*feeder layer*) para los hibridomas producidos en las fusiones celulares se consiguió mediante el cultivo previo de timocitos en las placas en las que estos se cultivaron.

Para ello, tras el sacrificio con éter dietílico y dislocación cervical, se extrajo el timo de ratones de la cepa BALB/c de 3 semanas de edad, en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar de nivel de seguridad P-2 y con material quirúrgico autoclavado. En una placa *petri* y con ayuda de espátulas el timo se disgregó en un volumen de 5 ml de medio completo: RPMI-1640 con SBF al 18 % y L-Glutamina 2 mM. La suspensión celular resultante se pasó a un tubo estéril y se dejaron sedimentar los fragmentos macroscópicos. El sobrenadante se pasó a otro tubo dónde se cambió el medio centrifugando a 1100 rpm durante diez minutos y añadiendo 5ml de medio completo. El número de timocitos obtenidos se contó en cámara de Neubauer con Azul Tripán al 0,4 % (Sigma Cat. nº T8154) y se ajustó la concentración de la suspensión a 7x10<sup>6</sup> cel/ml. A continuación se dispensaron 0,1 ml/pocillo (7x10<sup>5</sup> células por pocillo)

de dicha suspensión en placas de 96 pocillos (Costar Cat. nº 3596), que se utilizaron posteriormente en las fusiones celulares y en los primeros clonajes.

### **b.3) Fusión celular (mieloma-linfocito).**

La fusión celular se realizó en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar de nivel de seguridad P-2 y con material quirúrgico autoclavado.

En primer lugar se preparó el mieloma reagrupando en tubos de 50 ml el contenido de varios frascos de cultivo de la línea P3X63-Ag8.653, que se encontraba en fase de crecimiento exponencial. Estos tubos se centrifugaron a 1100 rpm durante diez minutos a 20 °C. Todos los sedimentos celulares resultantes se unificaron en 40 ml de medio completo, de los que se extrajo una pequeña alícuota para realizar un recuento de las células utilizando una cámara de Neubauer con Azul Tripán al 0,4 %.

Para la obtención de los esplenocitos, el ratón para la fusión se sacrificó con éter dietílico y dislocación cervical. Se sumergió en un vaso con etanol antes de introducirlo en la campana de flujo y una vez dentro, con tijeras y pinzas de disección estériles y previamente flameadas se extrajo el bazo, que se transfirió a una placa *petri* estéril con 5 ml de medio completo, donde se disgregó suavemente con ayuda de unas espátulas estériles.

El contenido de la placa se transfirió a un tubo de centrifuga, resuspendiendo fuertemente y varias veces con la pipeta para disgregar los grupos de células. Se dejaron sedimentar los fragmentos macroscópicos y se recogió el sobrenadante, que se centrifugó a 1000 rpm durante diez minutos. El sedimento celular se resuspendió en 2 ml de  $\text{CIN}_4$  al 0,85 % (Sigma Cat. nº A-0171) varias veces para lisar los glóbulos rojos. La suspensión se dejó en un baño a 37 °C durante 5 minutos y después se diluyó añadiendo de 10 a 20 ml de medio completo y resuspendiendo suavemente. El  $\text{CIN}_4$  diluido se retiró después de centrifugar a 1100 rpm durante 10 minutos a 20 °C y se sustituyó por 10 ml de medio completo nuevo. Para determinar la viabilidad celular de los esplenocitos, éstos se contaron en cámara de Neubauer con Azul Tripán al 0,4 %.

Una vez realizado el recuento celular de mieloma y de esplenocitos se calculó y ajustó el volumen de suspensión celular de mieloma necesario para añadir a las de bazo manteniendo una relación 1:5 (mieloma-bazo). Así mismo, se guardaron alícuotas de ambas líneas celulares para realizar los controles de crecimiento y selección de hibridomas, los cuales se ajustaron a una concentración final de  $1,5 \times 10^6$  células/ml y se dispensaron en una placa de 96 pocillos a razón de  $3 \times 10^5$  células/pocillo en medio selectivo: medio completo con HAT Hybri-max® (Sigma Cat. nº H-0262), que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina.

La mezcla mieloma-bazo se lavó hasta tres veces en medio incompleto (RPMI-1640 no suplementado con SBF), centrifugando a 1100 rpm diez minutos a 20 °C y resuspendiendo el sedimento en 20 ml del mismo. Después de retirar el sobrenadante del último lavado, el sedimento se separó del fondo del tubo golpeando suavemente la base y se añadió 1 ml de Polietilenglicol (PEG) al 50 % (Sigma Cat. n° 7181), a razón de 1ml/min y agitando muy suavemente. Con la punta de la pipeta se agitó la mezcla de 15 a 30 segundos e inmediatamente después se añadieron 20 ml de medio incompleto, a razón de 1 ml por minuto para diluir el PEG muy lentamente. Se sustituyó el medio incompleto con el PEG centrifugando a 1100 rpm durante diez minutos a 20 °C, retirando el sobrenadante y añadiendo 20 ml de medio completo de 10 en 10 ml y resuspendiendo con suavidad. El producto de la fusión se contó en cámara de Neubauer con Azul Tripán al 0,4 %, diferenciando entre células vivas, muertas y totales para calcular la viabilidad celular después de la fusión. Teniendo en cuenta esa viabilidad, se ajustó la concentración a  $2 \times 10^6$  células vivas/ml y el volumen resultante se transfirió a un frasco de 75 cm<sup>2</sup> (Corning Cat. n° 3376) mantenido en estufa a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> durante toda la noche junto con los controles de bazo y mieloma.

Al día siguiente, resuspendiendo con cuidado, se recogió el producto de la fusión del frasco de 75 cm<sup>2</sup> y se centrifugó en un tubo de 50 ml a 1100 rpm durante diez minutos a 20 °C. Se retiró el sobrenadante y se añadieron 20 ml de medio selectivo HAT, añadiéndolos de 10 en 10 ml y resuspendiendo con suavidad. De nuevo se realizó un recuento para calcular la viabilidad a las 24 horas después de la fusión, y se ajustó la concentración a  $3 \times 10^5$  células vivas/pocillo. El producto de la fusión se distribuyó en placas de 96 pocillos, previamente preparadas con timocitos (apartado 3.2.2.3.b.2.) a un volumen de 0,1 ml por pocillo, y se mantuvieron en estufa a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>.

#### **b.4) Mantenimiento y selección de los productos de fusión.**

Una vez distribuido el producto de la fusión en las placas de cultivo celular se observó la evolución de las distintas poblaciones celulares obtenidas. Los linfocitos sin fusionar y los híbridos linfocito-linfocito murieron pasados unos días. En cuanto a las células de mieloma y los híbridos mieloma-mieloma, éstos no pudieron sobrevivir en presencia del medio selectivo HAT Hybri-max® (Sigma Cat. n° H-0262) con hipoxantina, aminopterina y timidina, por ser poblaciones deficientes de la enzima hipoxantina-guanina-fosforibosil-transferasa (HGPRT). Sin embargo, los híbridos mieloma-linfocito viables resistieron al medio selectivo gracias a una ruta metabólica de rescate para la síntesis de nucleótidos púricos y pirimidínicos aportada por los linfocitos.

Pasados 15-20 días después de la fusión, se dejaron de observar células viables en la placa control de mieloma y bazo con medio selectivo con HAT (apartado 3.2.2.3.b.3.). Por tanto, en las placas con la fusión celular, todas las células en crecimiento eran híbridos mieloma-linfocito. El medio HAT se sustituyó por medio HT Hybri-max® (Sigma Cat. n° H-0137) con

hipoxantina y timidina, con el que se mantuvieron durante una semana antes de pasar al medio completo.

#### **b.4.1) Selección de los híbridos secretores.**

Con el objetivo de identificar los híbridos productores de inmunoglobulinas específicas frente a antígenos de *N. ceranae* se emplearon las técnicas de ELISA e IFI, utilizando en el primer caso el antígeno soluble (apartado 3.2.2.2.) de esporas purificadas de esta especie, y esporas completas en la técnica de IFI. Los hibridomas seleccionados se expandieron en placa de 24 pocillos (Nunc Cat. n° 143982).

##### **b.4.1.1) ELISA para la selección de híbridos secretores.**

Se intentó poner a punto una prueba de ELISA que permitiera estudiar los sobrenadantes de los pocillos que presentaron crecimiento de hibridomas en las placas de la fusión celular (96 pocillos), para el cribado de aquellos que produjeran anticuerpos específicos.

Para el tapizado de las placas de ELISA (96 pocillos, Nunc-Immuno Module Cat. n° 444865) se utilizó antígeno soluble de esporas de *N. ceranae* (apartado 3.2.2.2.) empleando 100 µl/pocillo de distintas concentraciones (0,4; 0,6; 0,8; 1; 1,5 y 2,5 µg) del mismo, diluido en tampón carbonato 0,1 M a pH 9,6. Éstas se incubaron toda la noche a 4 °C y, transcurrido este tiempo, las placas sensibilizadas se lavaron tres veces con PBS-Tween 20 al 0,05 %.

En el postapizado, los pocillos se bloquearon mediante la adición de 200 µl/pocillo de Albúmina Sérica Bovina (BSA) al 0,1 % en PBS 1x, durante una hora a 37 °C, lavándose de nuevo las placas igual que en el paso anterior.

Posteriormente, se añadieron 100 µl/pocillo de los sobrenadantes sin diluir. Así mismo, en cada placa se añadió un pocillo con medio completo como control negativo, que también sirvió como blanco. Se incubó durante una hora y media a 37 °C y se lavó.

Después del lavado se añadieron 100 µl/pocillo de un anticuerpo anti-Ig totales de ratón, conjugado con peroxidasa (Dako Cat. n° P-0161) que se diluyó en PBS-Tween 20 según las instrucciones del fabricante y se incubó una hora y media a 37 °C. Tras los lavados correspondientes se añadió el sustrato, orto-fenilenodiamina (OPD) al 0,04 % en tampón citrato-fosfato a pH 5, al que se añadieron 4 µl de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por cada 10 ml de solución en el momento de su uso. Se añadieron 100 µl/pocillo y se dejó incubar a temperatura ambiente y en oscuridad, hasta que los blancos comenzaron a adquirir color. La reacción se frenó mediante la adición de 50 µl/pocillo de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 3 N.



La lectura de las placas se realizó en espectrofotómetro a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 490 nm, obteniéndose las densidades ópticas (DO) del producto final coloreado.

#### **b.4.1.2) IFI para la selección de híbridos secretores.**

El protocolo de inmunofluorescencia se realizó en las mismas condiciones descritas anteriormente (apartado 3.2.2.3.a.2.1.) con ciertas modificaciones. En este caso se dispensaron 20  $\mu$ l por pocillo de cada sobrenadante sin diluir. Además, en cada porta se dejó un pocillo control negativo en el que se sólo se añadió PBS 1x, y otro en el que se dispensó como control positivo suero policlonal anti- *N. ceranae* proveniente de los ratones de fusión, diluido 1/1600 en PBS 1x.

#### **b.5) Clonaje por dilución límite de los híbridos seleccionados.**

Los híbridos positivos (productores de anticuerpos específicos), expandidos en placa de 24 pocillos, se clonaron por dilución límite para garantizar su monoespecificidad asegurando, que todas las células procedieran de una misma célula progenitora. Para ello, los híbridos productores seleccionados se diluyeron y se dispensaron a las concentraciones de 5, 1 y 0,5 células por pocillo, en placas de 96 pocillos previamente tapizadas con timocitos (apartado 3.2.2.3.b.2.). Se realizaron varios clonajes (al menos tres) de cada híbrido seleccionado hasta garantizar su "monoclonalidad" con una positividad del 100 % en las placas de 1 y 0,5 células/pocillo, mediante la técnica de IFI.

#### **b.6) Expansión de clones y congelación de células.**

Tanto los híbridos positivos procedentes de las placas de fusión como los clones seleccionados de cada híbrido (por su titulación, su estabilidad y ritmo de crecimiento) se congelaron en varias alícuotas. Así mismo se expandieron en placas de 24 pocillos y en frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>, de los que también se congelaron alícuotas como medida de seguridad.

La crioconservación se realizó centrifugando la suspensión celular a 1100 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente, eliminando el sobrenadante y resuspendiendo el sedimento con 1 - 1,5 ml de medio de congelación por vial (Nunc Cat. nº 340711). El medio de congelación se preparó con SBF al 90 % y DMSO al 10 % (Sigma Cat. nº D-2650). Inmediatamente después de añadir el medio de congelación, los criotubos se almacenaron a -80 °C en un contenedor para congelación NALGENE™ Cryo 1°C Freezing container (Nalgene Cat. nº 5100-001) con isopropanol (2-propanol, Applichem Cat. nº A3928), donde se mantuvieron durante veinticuatro horas antes de trasladarlos definitivamente al tanque de nitrógeno líquido.

### **b.7) Obtención de sobrenadantes saturados de anticuerpos monoclonales.**

Una vez que se congelaron al menos 4 alícuotas de cada híbrido o clon seleccionado y expandido a placa de 24 pocillos, estos se dejaron crecer hasta lograr la saturación del medio, (hasta garantizar la muerte celular del híbrido). Posteriormente se recogieron los sobrenadantes y se centrifugaron a 1100 rpm durante diez minutos para separar el sobrenadante del sedimento celular y, tras confirmar por IFI que seguían produciendo anticuerpos específicos, almacenarlos a -80 °C en pequeñas alícuotas con el fin de minimizar los ciclos de congelado y descongelado.

### **3.2.2.4. Producción de anticuerpos monoclonales *in vivo*.**

Para la producción de líquido ascítico con anticuerpos monoclonales se emplearon lotes de ratones de la cepa BALB/c (apartado 3.2.1.3), que se inocularon por vía intraperitoneal con 0,5 ml de pristano (2, 6, 10, 14 - tetrametilpentadecano, Sigma Cat. nº T-7640) por ratón, con agujas de 21 G. Después de 7-10 días, a cada lote se le administró intraperitonealmente un inóculo de  $1,5\text{-}2 \times 10^6$  células de uno de los híbridos seleccionados por ratón (en 1 ml de PBS), y se esperó a que se produjera la ascitis.

Después del desarrollo de ascitis visible, los ratones se evaluaron a diario (al menos una vez al día) y cuidadosamente, en busca de síntomas externos de dolor o distrés: pelo áspero, postura encorvada, distensión abdominal progresiva, disminución de la actividad, tumores sólidos, apariencia delgada y deshidratación. La obtención del líquido ascítico se llevó a cabo tan pronto como estos síntomas aparecieron, no sobrepasando nunca un máximo de tres punciones, después de las cuales el animal fue sacrificado por dislocación cervical.

El líquido ascítico se extrajo periódicamente por punción intraperitoneal en los cuadrantes inferiores de la cavidad abdominal con aguja 18 G. Éste se dejó gotear en un tubo que posteriormente se centrifugó a 2700 rpm durante 10 minutos a 4 °C, descartando el sedimento celular y congelando el sobrenadante (líquido ascítico) en alícuotas a -80 °C para su posterior titulación (apartado 3.3.2.3).

## **3.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES OBTENIDOS FRENTE A *Nosema* spp.**

### **3.3.1. MATERIAL BIOLÓGICO.**

Para la caracterización de los anticuerpos monoclonales objeto de este estudio se utilizó el siguiente material biológico:

### 3.3.1.1. Esporas.

Se emplearon esporas de *Nosema ceranae* y *Nosema apis* procedentes del CAR (apartado 3.1.1.1.) para la realización de las técnicas de ELISA, *Western Blot* e IFI.

Para el estudio de reacciones cruzadas se utilizaron además esporas de otras especies distintas de microsporidio: *Enterocytozoon bieneusi* [Dra. Águila, USP-CEU, España (del Águila y col., 1997)], *Encephalitozoon cuniculi*, cepa USP-A1 [Dra. Águila, USP-CEU, España (del Águila y col., 2001a)], *Encephalitozoon intestinalis*, cepa CDCV297 (Dr. Visvesvara, CDC, EEUU), *Encephalitozoon hellem*, cepa CDCV257 (Dr. Visvesvara, CDC, EEUU), *Ancaliia algerae* (Dra. Didier, Tulane National Primate Research, EEUU) y *Vittaforma corneae* (Dr. Visvesvara, CDC, EEUU).

### 3.3.2. MÉTODOS.

#### 3.3.2.1. Isotipado de los anticuerpos monoclonales.

Los sobrenadantes de los anticuerpos monoclonales seleccionados celulares se estudiaron con el fin de determinar el isotipo de inmunoglobulina secretada. Se empleó el kit *Pierce® Rapid Isotyping Kit with Kappa and Lambda-Mouse* (Termo Scientific Cat. nº 26179) según las especificaciones del fabricante para la realización e interpretación de los resultados.

#### 3.3.2.2. Purificación y tratamiento de las esporas.

Tanto la purificación como el tratamiento de las esporas se realizaron siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.1.2.1. Estas esporas se emplearon más tarde en las técnicas de IFI y *Western Blot*, así como para la extracción de antígeno soluble que se utilizó también en *Western Blot*.

#### 3.3.2.3. Titulación de sobrenadantes saturados y ascitis de los anticuerpos monoclonales.

La titulación de los sobrenadantes saturados y de los líquidos ascíticos se realizó mediante la técnica de IFI siguiendo la metodología empleada en el apartado 3.1.2.4.a.

Tanto los sobrenadantes como las ascitis se titularon frente a su especie homóloga: F1.7D2 y F4.1B11 frente a *N. ceranae*; F4.9G2 frente a *N. apis* y finalmente F1.6F10 frente a ambas especies.

Se dispensaron 20 µl de los sobrenadantes saturados de cada anticuerpo monoclonal a las diluciones: 1/25, 1/50, 1/100, 1/200, 1/400 y 1/800 en cada pocillo y por duplicado. En el caso del líquido ascítico producido por los híbridos F1.6F10, F1.7D2 y F4.9G2, las diluciones ensayadas fueron: 1/25, 1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600, 1/3200, 1/6400, 1/12800, 1/25600 y 1/51200. En cada porta además había un pocillo en el que se dispensó el diluyente, PBS 1x como control negativo y otro con suero policlonal frente a la especie en estudio (*N. apis* o *N. ceranae*) como control positivo.

#### **3.3.2.4. Estudio de reacciones cruzadas de los anticuerpos monoclonales.**

Para evaluar la posible presencia de reacciones cruzadas, tanto los sobrenadantes saturados como las ascitis de los anticuerpos monoclonales se estudiaron frente a las esporas de distintas especies de microsporidios: *N. apis*, *N. ceranae*, *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon cuniculi*, *E. intestinalis*, *E. hellem*, *Ancaliia algerae* y *Vittaforma corneae* (apartado 3.3.1.1.), mediante la técnica de IFI ya descrita en el apartado 3.1.2.4.a., pero con ciertas modificaciones que se describen a continuación.

##### **a) IFI para el estudio de reacciones cruzadas frente a la especie heteróloga de *Nosema*.**

De manera simultánea a las titulaciones de los sobrenadantes saturados y las ascitis, se llevó a cabo un estudio de reacciones cruzadas frente a las dos especies de *Nosema* que se encuentran en las abejas. Así, los anticuerpos monoclonales F1.7D2 y F4.1B11, anti *N. ceranae*, se titularon también frente a *N. apis* y el F4.9G2, anti *N. apis*, frente a *N. ceranae*.

Las diluciones que se utilizaron en este estudio de reacciones cruzadas fueron las mismas que las descritas para las titulaciones (apartado 3.3.2.3.) y así como las condiciones de la IFI.

##### **b) IFI para el estudio de reacciones cruzadas frente a otros géneros de microsporidios.**

Una vez determinado el título de los anticuerpos monoclonales tanto en los sobrenadantes saturados como en las ascitis, se realizó un estudio de reacciones cruzadas frente a otros géneros de microsporidios mediante la técnica de IFI.

Se tapizaron portaobjetos de 10 pocillos (Biomérieux Cat. nº. 75 751), con 5 µl/pocillo de una suspensión de esporas de *Encephalitozoon intestinalis*, *E. cuniculi*, *E. hellem*, *Enterocytozoon*

*bieneusi*, *Ancaliia algerae* o *Vittaforma corneae*. La concentración de tapizado fue de  $10^7$  esporas/ml. Las condiciones de fijación y conservación de los portaobjetos tapizados fueron las descritas en el apartado 3.1.2.4.a.

Las condiciones de la IFI, así como las diluciones escogidas, fueron las mismas que en el estudio de las titulaciones (apartado 3.3.2.3.).

### 3.3.2.5. Obtención de antígeno soluble de espora.

Para la caracterización de los perfiles de inmunorreconocimiento de los anticuerpos monoclonales se procedió a obtener antígeno soluble de las esporas de *N. apis* y *N. ceranae*. Con el objetivo de optimizar el rendimiento de dicha obtención, se probaron distintas modificaciones del método descrito previamente en el apartado 3.2.2.2. La suspensión de esporas ( $10^8$  esporas totales) previamente tratada con SDS y 2-mercaptoetanol en el homogeneizador FastPrep®-24 (MP Biomedicals Cat. nº 6004500) se sometió a distintos protocolos de agitación, que se muestran en la Tabla 3.4.:

**Tabla 3.3.1.** Protocolos de obtención de antígeno soluble.

MÉTODO	TIEMPO	Nº BATIDAS	CICLOS
Águila y col., 2001a	45	5	1
Modificación 1	45	3	4
Modificación 2	60	10	1

La velocidad de las batidas fue en todos los casos de 6,5 m/s (velocidad máxima permitida por la máquina). Además, entre batida y batida se dejó enfriar en baño de hielo durante diez minutos.

#### a) Valoración de la concentración de proteínas.

La determinación de la concentración de proteínas en el antígeno soluble obtenido se realizó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976), siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.2.2.2.a.

### 3.3.2.6. Caracterización antigénica de *N. ceranae* y *N. apis* mediante electroforesis en geles de poliacrilamida 12 – 15 %, SDS-PAGE.

#### a) Tratamiento de la muestra.

Con el fin de determinar las condiciones óptimas para la electroforesis, se utilizaron distintas concentraciones de antígeno soluble de *N. ceranae* por calle: 0,6; 0,8; 1; 5 y 10 µg. Con el fin de alcanzar las concentraciones más altas, en algunos casos se realizó un paso previo de liofilización para concentrar más el antígeno soluble (apartado 3.3.2.5.). Paralelamente también se dispensaron distintas cantidades de espora completa por calle: 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup>, 0,25x10<sup>7</sup>, 0,5x10<sup>7</sup> y 1x10<sup>7</sup> esporas totales. Se probaron distintos tratamientos químicos, los cuales se detallan a continuación (Tabla 3.5.):

**Tabla 3.3.2.** Tratamientos químicos para las muestras de electroforesis

	ANTÍGENO	PRETRATAMIENTO	TRATAMIENTO	INCUBACIÓN
(del Águila y col., 2001b)	Espora Completa	Lavado con Tris-HCl 0,05 M pH 8	Tris-HCl 0,1 M pH 8 SDS 10 % y Urea 9 M	65 °C 15 min.
	Antígeno Soluble	-----		
(Laemmli, 1970)	Espora completa y/o	-----	Tris-HCl 0,5M pH 6,8, Glicerol, SDS 10 %, 2-Mercaptoetanol y Azul Bromofenol 1%.	95 °C 4 min.
	Antígeno Soluble			
NuPAGE®	Espora completa y/o	-----	Nupage LDS Sample Buffer 4x (Invitrogen Cat. nº NP0007) Nupage Reducing Agent 10x (Invitrogen Cat. nº NP0009)	70 °C 10 min.
	Antígeno Soluble			

#### b) Electroforesis.

Las electroforesis se realizaron en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) siguiendo el método descrito por Laemmli (1970) y revisado por Hames (Hames, 1986), utilizando el equipo *Mini-PROTEAN® 3 Cell* (Biorad Cat. nº 165-3301). Los geles se constituyeron con un gel concentrador al 4 % y un gel de separación del 12 %, o del 15 % para una mejor separación de las bandas de bajo peso molecular. El tampón de electrodos Tris-Glicina a pH 8,3 se preparó en cuatro litros de agua destilada con 54,4 g de Glicina, 12 g de Tris y 4g de SDS.

En cada calle del gel de electroforesis se cargaron 20 µl que contenían  $1 \times 10^7$  esporas totales (de *N. ceranae* o *N. apis*) por calle, tratadas con NuPAGE® de Invitrogen (apartado 3.3.2.6.a.). Como marcador de peso molecular se utilizó el marcador preteñido *Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range* (Biorad Cat. nº 161- 0318), tratado según las indicaciones del fabricante.

Las electroforesis se realizaron a 60 mA y 200 V y se finalizaron cuando la banda de menor peso molecular llegó al final del gel. Finalizadas las electroforesis los geles destinados a la tinción de plata se mantuvieron en metanol al 30 % a 4 °C hasta su posterior utilización (apartado 3.3.2.6.c.), y los destinados al *Western Blot* se mantuvieron en el tampón de transferencia (apartado 3.3.2.7.).

### **c) Tinción de plata para geles de poliacrilamida.**

Antes de realizar la tinción, los geles de electroforesis conservados en metanol al 30 % y a 4°C, se fijaron durante una hora en una solución de Ácido Acético (10 %), Metanol (50 %) y agua Mili-Q (40 %). La solución fijadora se retiró y se reservó para su posterior utilización. Los geles se lavaron tres veces en metanol al 50 % en agua Mili-Q durante veinte minutos cada vez.

Seguidamente, se sumergieron 2-3 minutos en Tiosulfato de Sodio pentahidratado (Sigma Cat. nº S-6672) a una concentración de 0,6 mg/ml. Se eliminó el Tiosulfato y el exceso se retiró con tres lavados en agua Mili-Q y agitando manualmente.

A continuación los geles se trataron con 50 ml de una solución de Nitrato de Plata (Panreac Cat. nº 131459) a una concentración de 3 mg/ml y 0,375 ml de Formaldehído (Panreac Cat. nº 141328), en la que se mantuvo durante diez minutos en agitación constante. Posteriormente el gel se lavó de igual manera que en el paso anterior.

Para el revelado de los perfiles proteicos se añadieron 50 ml de una solución de Carbonato de Sodio (Sigma Cat. nº S-2127) a una concentración de 60 mg/ml, 0,3 ml de Formaldehído y 0,5 ml de la solución de Tiosulfato de Sodio utilizada anteriormente. Se agitó manualmente y se observó la reacción hasta que la coloración alcanzó la intensidad deseada.

La reacción se frenó retirando el Carbonato y lavando, primero con la solución en la que se había fijado (Ácido Acético, Metanol y agua Mili-Q) y después solamente con agua Mili-Q. Antes de secar los geles para su conservación, estos se mantuvieron previamente en metanol al 30 % para que recuperaran su tamaño original.

**d) Determinación de perfiles proteicos.**

La determinación de los pesos moleculares de las fracciones proteicas obtenidas en las electroforesis se realizó siguiendo el método de Weber y Osborn (1969), mediante extrapolación en una curva de calibrado elaborada a partir de los marcadores de peso molecular empleados en cada una de ellas ( $\log P_m$  vs.  $R_f$ ).

**3.3.2.7. Determinación de perfiles de inmunorreconocimiento de los anticuerpos monoclonales mediante inmunoelectrotransferencia (Western Blot).****a) Electroforesis.**

Se realizó la electroforesis en geles SDS-PAGE, empleando el doble de esporas completas por calle (*N. ceranae* o *N. apis*) que las utilizadas para los geles teñidos con plata (apartado 3.3.2.6.a.). Los perfiles antigénicos se transfirieron a membranas de PVDF (Polivinilideno Difluoro) de 0,22  $\mu m$  de poro (Biorad Cat. n° 162-0184) en una cubeta *MINI Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* (Biorad Cat. n° 165-3302), utilizando un tampón de transferencia con Tris 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol al 20 % a pH 8,3. La transferencia se realizó a un voltaje constante de 100 V durante dos horas. Las membranas se trataron previamente con metanol absoluto y se equilibraron en el tampón de transferencia.

**b) Bloqueo de la membrana.**

Para minimizar las uniones inespecíficas de los anticuerpos, las membranas de PVDF se bloquearon en una solución de Albúmina Sérica Bovina (BSA) en PBS-Tween 20 al 1 %, en la que se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente.

**c) Inmunorreconocimiento de perfiles antigénicos.**

Tras realizar la transferencia y el bloqueo de las membranas se procedió a la tinción de las mismas con Rojo Ponceau (Sigma Cat. n° 78376) al 2 % durante 5 minutos. Las partes de las membranas en las que pudieron observarse proteínas transferidas se cortaron en tiras que se lavaron en PBS-Tween 20 al 0,3 % durante unos minutos para retirar la tinción. Posteriormente se almacenaron a 4 °C en PBS-Tween 20 limpio.

Antes del revelado de las tiras, éstas se sometieron a cuatro lavados de 5 minutos en PBS-Tween 20 al 0,3 %. Posteriormente se incubaron con los sobrenadantes saturados de los anticuerpos monoclonales en estudio (apartado 3.2.2.3.b.7.). Cada sobrenadante se enfrentó



con ambas especies de *Nosema* (*N. apis* y *N. ceranae*). Así mismo, como control se utilizaron un suero policlonal de ratón frente a *N. ceranae* diluido 1/200 y un suero policlonal de conejo frente a *N. apis* a la dilución 1/500. Estas incubaciones tuvieron una duración de dos horas.

Tras la incubación, las tiras se lavaron 3 veces con PBS-Tween 20 al 0,3 % y una vez con PBS 1x (10 minutos cada lavado), y se incubaron con el anticuerpo secundario. Para las tiras incubadas con los anticuerpos monoclonales o con el policlonal de ratón se utilizaron anticuerpos de conejo anti inmunoglobulinas totales de ratón marcados con peroxidasa (Dako Cytomation Cat. nº P 0161). Así mismo las tiras tratadas con el policlonal de conejo se incubaron con anticuerpos anti inmunoglobulina de conejo conjugados con peroxidasa (Dako Cytomation Cat. nº A 9169). Ambos conjugados se utilizaron a las diluciones indicadas por la casa comercial en PBS-Tween 20 al 0,3 %.

Para el revelado y la visualización de las bandas antigénicas, las membranas se lavaron de nuevo con PBS-Tween 20 al 0,3 % y se hicieron reaccionar con el sustrato [0,035 g de diaminobenzidina (DAB, Sigma Cat. nº D-5637) y 7 µl de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Sigma Cat. nº H-1009) en 70 ml de PBS 1x], con el que se incubaron en oscuridad y agitación constante hasta el desarrollo de las bandas. La reacción se frenó con varios lavados en agua destilada, después de los cuales las tiras se dejaron secar en oscuridad sobre una placa de vidrio.

### **3.4. EVALUACIÓN DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES EN EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE *N. ceranae* y *N. apis*.**

#### **3.4.1. MATERIAL BIOLÓGICO.**

Para la consecución de los objetivos indicados previamente se utilizó el material biológico que se describe a continuación:

##### **3.4.1.1. Muestras de colmenas.**

Con el objetivo de validar el método de IFI para el diagnóstico diferencial de *N. apis* y *N. ceranae* empleando los anticuerpos monoclonales seleccionados, se realizó un estudio similar al llevado a cabo con los anticuerpos policlonales. Se utilizaron las mismas muestras (apartado 3.1.1.3.): 180 colmenas infectadas por *N. ceranae* y/o *N. apis*, o libres de infección en las que previamente se había estudiado la presencia de estas especies mediante microscopía óptica con contraste de fases y mediante técnicas moleculares (PCR múltiple) en el Centro Apícola Regional (CAR).

### 3.4.1.2. Anticuerpo policlonal.

Se utilizó el anticuerpo policlonal anti *N. ceranae* procedente del suero de conejos Nueva Zelanda inoculados con esporas de esta especie (apartado 3.1.).

### 3.4.1.3. Anticuerpos monoclonales.

Se utilizaron los sobrenadantes saturados de los anticuerpos monoclonales seleccionados y caracterizados en los apartados 3.2. y 3.3 respectivamente: F1. 6F10 frente a *N. ceranae* y *N. apis*, F1. 7D2 y F4. 1B11 frente a *N. ceranae* y F4. 9G2 frente a *N. apis*.

## 3.4.2. MÉTODOS.

### 3.4.2.1. Tratamiento de las muestras de colmenas.

Al igual que en el apartado 3.1.2.6.a., las partes alícuotas de los homogeneizados de las colmenas se observaron en el microscopio óptico para determinar la cantidad de esporas y/o residuos que contenían. En función de esto, las muestras se utilizaron diluidas con formalina, sedimentadas o directamente sin procesar, para garantizar una concentración de esporas adecuada para el tapizado de los portaobjetos, así como la ausencia de residuos y artefactos que pudieran interferir la lectura de la IFI.

### 3.4.2.2. IFI para el diagnóstico diferencial entre *N. ceranae* y *N. apis*.

Los portaobjetos se tapizaron con las 180 muestras de colmenas previamente procesadas y con esporas purificadas de *N. ceranae* y *N. apis* que sirvieron como control, de igual manera a la descrita en el apartado 3.2.2.6.b. Posteriormente se adicionaron 20 µl/pocillo de los sobrenadantes saturados de los diferentes anticuerpos monoclonales seleccionados a las diluciones 1/25 para los anticuerpos F1. 6F10 y F4. 1B11, 1/50 para el F1. 7D2 y 1/5 para el F4. 9G2. Debido a que todos los anticuerpos monoclonales seleccionados presentaban un isotipo IgM (apartado 4.3.1.), se decidió utilizar un conjugado anti IgM (cadena específica µ) de ratón marcado con cianina (Jackson Cat. nº 115-096-075) con longitudes de onda (λ) de excitación a 489 nm y de emisión a 506 nm.

Aparte de estos cambios, para la realización de la técnica de inmunofluorescencia indirecta se siguió la misma metodología descrita en el apartado 3.1.2.4.a.

### **3.4.2.3. Análisis estadístico de los resultados.**

Se compararon los resultados obtenidos de las 180 colmenas mediante la técnica de IFI desarrollada en el presente estudio utilizando los anticuerpos monoclonales seleccionados, con los resultados obtenidos anteriormente utilizando los anticuerpos policlonales (apartado 4.1.1.4.). Así mismo se compararon con los resultados facilitados por el CAR y obtenidos mediante microscopía de contraste de fases, así como con la técnica de biología molecular de la PCR múltiple (Martin-Hernandez y col., 2007).

Al igual que en el apartado 3.1.2.7, se realizó un Test Diagnóstico (EPIDAT 3.1) (Vidal y col., 2004) para comparar la sensibilidad y la especificidad de las distintas técnicas, considerando como patrón de oro la técnica de PCR utilizada en el CAR. Paralelamente se realizaron un análisis de concordancia (Kappa de Cohen, interpretado según la escala elaborada por Altman, 1991) y una comparación de proporciones (*Chi* cuadrado). Ambos análisis se ejecutaron con el programa estadístico PASW 18 (IBM SPSS).

#### 4. RESULTADOS.

##### 4.1. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES FRENTE A *N. ceranae* Y *N. apis*.

##### 4.1.1. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES.

##### 4.1.1.1. Purificación y tratamiento de las esporas.

Como las esporas suministradas por el CAR procedían de un macerado del aparato digestivo de abejas infectadas (apartado 3.1.1.1.), éstas se sometieron a un proceso de purificación para asegurar la pureza de los inóculos. En la Tabla 4.1.1. se muestran los recuentos antes y después de dicho tratamiento.

Una vez finalizada la purificación de las esporas siguiendo el método descrito en el apartado 3.1.2.1., se obtuvo un rendimiento del 50 % aproximadamente. Se observó que el 50 % de esporas restante quedaba disperso en la fase de Percoll sin llegar a separarse del resto de los residuos del macerado. Aún así, dicha fase se conservó también a 4 °C y fue destinada a usos que no requirieran esporas muy purificadas, como el tapizado de portaobjetos para IFI.

**Tabla 4.1.1.** Lotes de esporas recibidas y recuentos antes y después de la purificación.

COLMENAS DE ORIGEN	ESPECIE	ESPORAS TOTALES INICIALES (x10 <sup>7</sup> )*	ESPORAS TOTALES FINALES (x10 <sup>7</sup> )**
<b>B9</b>	<i>N. ceranae</i>	8,2	4,1
<b>BN-9</b>	<i>N. ceranae</i>	17,2	3
<b>BN-10</b>	<i>N. ceranae</i>	16,5	9,2
<b>BN-11</b>	<i>N. ceranae</i>	8,4	2,6
<b>BN9 y B9</b>	<i>N. ceranae</i>	41,6	35,9
<b>BN-10 y B-9</b>	<i>N. ceranae</i>	9,6	4,9
<b>BN-3, 7 y 11</b>	<i>N. ceranae</i>	29	7,7
<b>BN-2, 9, 10 y B9</b>	<i>N. ceranae</i>	24,1	18,2
<b>BN-3, 4, 7 y 11</b>	<i>N. ceranae</i>	86,6	35,4
<b>BN-3, 4, 7, 11 y 12</b>	<i>N. ceranae</i>	45,5	22,6
<b>A+C Sucias</b>	<i>N. apis+N. ceranae</i>	115,5	75
<b>BN-12</b>	<i>N. apis+N. ceranae</i>	47,4	44,5
<b>BN-2, 5 y B2</b>	<i>N. apis+N. ceranae</i>	24,9	15,5
<b>BN-5, 8, 12 y B2</b>	<i>N. apis+N. ceranae</i>	28,7	16,5
<b>BN-2, 5, 6, 8 y 10</b>	<i>N. apis+N. ceranae</i>	52	44,2

\*Tras el tamizado. \*\*Tras la purificación y el tratamiento.

#### 4.1.1.2. Titulación de los sueros policlonales.

Los sueros policlonales obtenidos en cada una de las sangrías realizadas a los cuatro conejos inmunizados con *N. apis* y *N. ceranae* se titularon utilizando la técnica de IFI. Se utilizaron diluciones dobles seriadas desde la 1/100 hasta la 1/12800, cuyos resultados se muestran en las tablas 4.1.2., 4.1.3., 4.1.4. y 4.1.5.

**Tabla 4.1.2.** Resultados de la titulación de los sueros obtenidos del **Conejo 1** inmunizado con *N. ceranae*.

Sangría	Antígeno	DILUCIONES							
		1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800
<b>S0</b>	<i>N. ceranae</i>	+/-	+/-	-	-	-	NR	NR	NR
	<i>N. apis</i>	+/-	-	-	-	-	NR	NR	NR
<b>S1</b>	<i>N. ceranae</i>	++	+	+/-	-	-	NR	NR	NR
	<i>N. apis</i>	+/-	-	-	-	-	NR	NR	NR
<b>S2</b>	<i>N. ceranae</i>	+++	+++	+++	+++	++	NR	NR	NR
	<i>N. apis</i>	+/-	+/-	-	-	-	NR	NR	NR
<b>S3</b>	<i>N. ceranae</i>	+++	+++	+++	+++	++	+	+	NR
	<i>N. apis</i>	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	NR
<b>S4</b>	<i>N. ceranae</i>	+++	+++	+++	+++	++	+	+/-	NR
	<i>N. apis</i>	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	NR
<b>SM</b>	<i>N. ceranae</i>	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+/-
	<i>N. apis</i>	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-	-

SM = Sangría a muerte; NR= No realizado; +++ = Fluorescencia fuerte; ++ = Fluorescencia moderada; + = Fluorescencia débil; +/- = Fluorescencia débil sólo en algunas esporas; - = Sin fluorescencia.

**Tabla 4.1.3.** Resultados de la titulación de los sueros obtenidos del **Conejo 2** inmunizado con *N. ceranae*.

Sangría	Antígeno	DILUCIONES							
		1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800
<b>S0</b>	<i>N. ceranae</i>	+/-	-	-	-	-	NR	NR	NR
	<i>N. apis</i>	+/-	-	-	-	-	NR	NR	NR
<b>S1</b>	<i>N. ceranae</i>	++	+	+/-	+/-	-	NR	NR	NR
	<i>N. apis</i>	+/-	+/-	-	-	-	NR	NR	NR
<b>S2</b>	<i>N. ceranae</i>	+++	++	+	+	+/-	NR	NR	NR
	<i>N. apis</i>	+/-	+/-	-	-	-	NR	NR	NR
<b>S3</b>	<i>N. ceranae</i>	+++	+++	++	+	+	NR	NR	NR
	<i>N. apis</i>	+/-	+/-	+/-	-	-	NR	NR	NR
<b>S4</b>	<i>N. ceranae</i>	+++	+++	++	+	+	+/-	NR	NR
	<i>N. apis</i>	+/-	+/-	-	-	-	-	NR	NR

NR = No realizado; +++ = Fluorescencia fuerte; ++ = Fluorescencia moderada; + = Fluorescencia débil; +/- = Fluorescencia débil sólo en algunas esporas; - = Sin fluorescencia.

Los sueros policlonales anti-*N. ceranae* obtenidos del Conejo 1 (Tabla 4.1.2.) son los que alcanzaron un título mayor, hasta 6400 en la tercera sangría y la sangría a muerte. En el caso del Conejo 2 (Tabla 4.1.3.) no se alcanzaron títulos tan elevados (1600 es el máximo, en S3 y S4). No se muestran datos de la sangría a muerte de éste animal ya que murió antes de poder llevarla a cabo.

**Tabla 4.1.4.** Resultados de la titulación de los sueros obtenidos del **Conejo 3** inmunizado con *N. apis*.

Sangría	Antígeno	DILUCIONES							
		1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800
S0	<i>N. ceranae</i>	+/-	+/-	+/-	-	-	NR	NR	NR
	<i>N. apis</i>	+/-	+/-	-	-	-	NR	NR	NR
S1	<i>N. ceranae</i>	+	+/-	+/-	+/-	+/-	NR	NR	NR
	<i>N. apis</i>	+	+/-	-	-	-	NR	NR	NR

NR = No realizado. +++ = Fluorescencia fuerte; ++ = Fluorescencia moderada; + = Fluorescencia débil; +/- = Fluorescencia débil sólo en algunas esporas; - = Sin fluorescencia.

**Tabla 4.1.5.** Resultados de la titulación de los sueros obtenidos del **Conejo 4** inmunizado con *N. apis*.

Sangría	Antígeno	DILUCIONES							
		1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800
S0	<i>N. ceranae</i>	+	+	+/-	+/-	-	NR	NR	NR
	<i>N. apis</i>	+/-	+/-	-	-	-	NR	NR	NR
S1	<i>N. ceranae</i>	++	+	+	+/-	+/-	NR	NR	NR
	<i>N. apis</i>	+	+	+/-	+/-	+/-	NR	NR	NR

NR = No realizado. +++ = Fluorescencia fuerte; ++ = Fluorescencia moderada; + = Fluorescencia débil; +/- = Fluorescencia débil sólo en algunas esporas; - = Sin fluorescencia.

En cuanto a los conejos inoculados con esporas de *N. apis* (Tablas 4.1.4. y 4.1.5.) sólo se muestran los resultados de las dos primeras sangrías ya que se suspendió el protocolo de inmunización debido a una mínima respuesta frente a *N. apis* en el caso del Conejo 3 y la presencia de reacciones cruzadas frente a *N. ceranae* en ambos conejos, detectadas en un estudio que se realizó de forma simultánea a las titulaciones (apartado 4.1.1.3.).

#### 4.1.1.3. Estudio de reacciones cruzadas.

##### a) IFI para el estudio de reacciones cruzadas frente a la especie heteróloga de *Nosema*.

En paralelo a la titulación de los sueros obtenidos, se hizo un estudio de reacciones cruzadas entre *N. ceranae* y *N. apis*. Así, los sueros de los conejos inoculados con *N. apis* se

ensayaron frente a *N. ceranae*, y los de los conejos inmunizados con *N. ceranae* frente a *N. apis*, obteniendo los resultados mostrados en las tablas 4.1.2., 4.1.3., 4.1.4. y 4.1.5.

Con los sueros policlonales anti-*N. ceranae*, en todas las sangrías se observó una muy débil reacción cruzada con *N. apis*, aunque ésta desapareció en las diluciones más altas de cada una de ellas. En el caso del Conejo 1 (Tabla 4.1.2.), la reacción cruzada con *N. apis* desapareció a la dilución 1/200 en la sangría 1, y a la 1/400 en la sangría 2. Aumentó hasta la 1/3200 en las sangrías 3 y 4 y volvió a disminuir en la 5, desapareciendo en la 1/1600. Con el Conejo 2 (Tabla 4.1.3.), esta reacción cruzada desapareció en las diluciones 1/400 en las sangrías 1 y 2, en la 1/800 de la sangría 3 y en la 1/400 de la sangría 4. En todo caso, ninguna de estas reacciones fue lo suficientemente intensa para considerar un título.

En cuanto a los sueros policlonales anti-*N. apis* (Tablas 4.1.4. y 4.1.5.), se observó en ambos conejos y desde la primera sangría reacción cruzada con *N. ceranae*, de fluorescencia más intensa incluso que la observada para el antígeno inoculado, lo que llevó a la suspensión de dicho protocolo.

#### **b) IFI para el estudio de reacciones cruzadas frente a otros géneros de microsporidios.**

Para una caracterización más completa, se realizó un estudio de reacciones cruzadas del antisuero obtenido en la última sangría del Conejo 1, el cual se utilizó posteriormente para la validación del método de IFI para el diagnóstico de *N. ceranae* en muestras de colmenas (apartado 3.1.2.6).

Para realizar la técnica de IFI se utilizaron diluciones de la 1/800 a la 1/2400 de este suero. No se observaron reacciones cruzadas con ninguna de las especies de microsporidios utilizadas: *E. intestinalis*, *E. cuniculi*, *E. hellem*, *E. bienewsi*, *V. corneae* y *A. algerae* (apartado 3.1.1.1.).

#### **4.1.1.4. Diagnóstico de *N. ceranae* utilizando los anticuerpos policlonales.**

Se llevó a cabo un estudio para detectar mediante IFI la presencia de *N. ceranae* en 180 colmenas, utilizando el anticuerpo policlonal obtenido frente a *N. ceranae* (sangría a muerte del Conejo 1). En la Tabla 4.1.6. se muestran los resultados obtenidos en las 180 colmenas mediante la técnica de IFI así como los obtenidos previamente en el CAR utilizando microscopía óptica con contraste de fases (MO) y PCR múltiple (Martin-Hernandez y col., 2007).

**Tabla 4.1.6.** Detección de *N. ceranae* en 180 colmenas mediante PCR, inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando el anticuerpo policlonal (Pc) de conejo frente a *N. ceranae* y microscopía óptica (MO).

NºREGISTRO	PCR	IFI (Pc)	MO
PA 169 /06	a+c	cer +	apis
PA 347 /06	a+c	cer -	apis
PA 689 /06	a+c	cer +	apis
PA 1413 /06	a+c	cer +	apis
PA 1466 /06	a+c	cer +	apis
PA 1473 /06	a+c	cer +	apis
PA 1568 /06	a+c	cer +	apis
PA 1604 /06	a+c	cer +	apis
PA 406 /06	a+c	cer +	cer
PA 1003 /06	a+c	cer +	cer
PA 524 /06	a+c	cer +	a+c
PA 538 /06	a+c	cer +	a+c
PA 583 /06	a+c	cer +	a+c
PA 645 /06	a+c	cer +	a+c
PA 692 /06	a+c	cer +	a+c
PA 787 /06	a+c	cer +	a+c
PA 839 /06	a+c	cer +	a+c
PA 895 /06	a+c	cer +	a+c
PA 1002 /06	a+c	cer +	a+c
PA 1030 /06	a+c	cer +	a+c
PA 1063 /06	a+c	cer +	a+c
PA 1159 /06	a+c	cer +	a+c
PA 1171 /06	a+c	cer +	a+c
PA 1225 /06	a+c	cer +	a+c
PA 1314 /06	a+c	cer +	a+c
PA 1345 /06	a+c	cer +	a+c
PA 1431 /06	a+c	cer +	a+c
PA 1433 /06	a+c	cer +	a+c
PA 1471 /06	a+c	cer -	a+c
PA 1484 /06	a+c	cer +	a+c
PA 191 /07	a+c	cer +	a+c
PA 695 /06	cer	cer +	apis
PA 209 /06	cer	cer +	cer
PA 215 /06	cer	cer +	cer
PA 216 /06	cer	cer +	cer
PA 218 /06	cer	cer +	cer
PA 296 /06	cer	cer +	cer
PA 300 /06	cer	cer +	cer
PA 301 /06	cer	cer +	cer
PA 320 /06	cer	cer +	cer
PA 358 /06	cer	cer +	cer
PA 367 /06	cer	cer +	cer
PA 393 /06	cer	cer +	cer
PA 417 /06	cer	cer +	cer
PA 444 /06	cer	cer +	cer

PCR = a+c ; n = 31

a+c = Presencia de *N. apis* y *N. ceranae*; cer = Presencia de *N. ceranae*; apis = Presencia de *N. apis*.

 Falso negativo.



**Tabla 4.1.6.** (Continuación) Detección de *N. ceranae* en 180 colmenas mediante PCR, inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando el anticuerpo policlonal (Pc) de conejo frente a *N. ceranae* y microscopía óptica (MO).

NºREGISTRO	PCR	IFI (Pc)	MO
PA 445 /06	cer	cer +	cer
PA 452 /06	cer	cer +	cer
PA 465 /06	cer	cer +	cer
PA 466 /06	cer	cer +	cer
PA 999 /06	cer	cer +	cer
PA 1000 /06	cer	cer -	cer
PA 1001 /06	cer	cer -	cer
PA 1010 /06	cer	cer +	cer
PA 1011 /06	cer	cer +	cer
PA 1015 /06	cer	cer +	cer
PA 1019 /06	cer	cer +	cer
PA 1025 /06	cer	cer +	cer
PA 1026 /06	cer	cer +	cer
PA 1027 /06	cer	cer +	cer
PA 1029 /06	cer	cer +	cer
PA 1032 /06	cer	cer +	cer
PA 1033 /06	cer	cer +	cer
PA 1034 /06	cer	cer +	cer
PA 1036 /06	cer	cer +	cer
PA 1038 /06	cer	cer +	cer
PA 1040 /06	cer	cer +	cer
PA 1041 /06	cer	cer +	cer
PA 1046 /06	cer	cer +	cer
PA 1048 /06	cer	cer +	cer
PA 1049 /06	cer	cer +	cer
PA 1051 /06	cer	cer +	cer
PA 1053 /06	cer	cer +	cer
PA 1054 /06	cer	cer +	cer
PA 1055 /06	cer	cer +	cer
PA 357 /06	cer	cer +	a+c
PA 434 /06	cer	cer +	a+c
PA 447 /06	cer	cer +	a+c
PA 532 /06	cer	cer +	a+c
PA 533 /06	cer	cer +	a+c
PA 543 /06	cer	cer +	a+c
PA 544 /06	cer	cer +	a+c
PA 764 /06	cer	cer +	a+c
PA 1091 /06	cer	cer +	a+c
PA 1100 /06	cer	cer +	a+c
PA 1175 /06	cer	cer +	a+c
PA 1179 /06	cer	cer +	a+c
PA 1255 /06	cer	cer +	a+c
PA 1268 /06	cer	cer +	a+c
PA 1490 /06	cer	cer +	a+c
PA 116 /07	cer	cer +	a+c

PCR = cer; n = 63

a+c = Presencia de *N. apis* y *N. ceranae*; cer = Presencia de *N. ceranae*; apis = Presencia de *N. apis*.

 Falso negativo.

**Tabla 4.1.6.** (Continuación) Detección de *N. ceranae* en 180 colmenas mediante PCR, inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando el anticuerpo policlonal (Pc) de conejo frente a *N. ceranae* y microscopía óptica (MO).

	NºREGISTRO	PCR	IFI (Pc)	MO
PCR = apis; n = 42	PA 144 /07	cer	cer +	a+c
	PA 145 /07	cer	cer +	a+c
	PA 198 /06	cer	cer +	-
	PA 351 /06	cer	cer -	-
	PA 166 /06	apis	cer -	apis
	PA 170 /06	apis	cer -	apis
	PA 176 /06	apis	cer -	apis
	PA 394 /06	apis	cer -	apis
	PA 418 /06	apis	cer -	apis
	PA 464 /06	apis	cer -	apis
	PA 535 /06	apis	cer -	apis
	PA 694 /06	apis	cer -	apis
	PA 703 /06	apis	cer -	apis
	PA 780 /06	apis	cer -	apis
	PA 823 /06	apis	cer -	apis
	PA 837 /06	apis	cer -	apis
	PA 838 /06	apis	cer -	apis
	PA 841 /06	apis	cer -	apis
	PA 853 /06	apis	cer -	apis
	PA 864 /06	apis	cer -	apis
	PA 874 /06	apis	cer -	apis
	PA 923 /06	apis	cer -	apis
	PA 926 /06	apis	cer -	apis
	PA 1117 /06	apis	cer -	apis
	PA 1119 /06	apis	cer -	apis
	PA 1177 /06	apis	cer -	apis
	PA 1182 /06	apis	cer -	apis
	PA 1313 /06	apis	cer +	apis
	PA 1320 /06	apis	cer -	apis
	PA 1423 /06	apis	cer -	apis
	PA 1442 /06	apis	cer -	apis
	PA 1463 /06	apis	cer -	apis
	PA 1598 /06	apis	cer -	apis
	PA 1605 /06	apis	cer -	apis
	PA 1642 /06	apis	cer -	apis
	PA 1654 /06	apis	cer +	apis
	PA 1747 /06	apis	cer -	apis
	PA 1769 /06	apis	cer -	apis
	PA 1770 /06	apis	cer -	apis
	PA 348 /06	apis	cer -	cer
	PA 364 /06	apis	cer -	a+c
	PA 398 /06	apis	cer -	a+c
	PA 556 /06	apis	cer +	a+c
	PA 693 /06	apis	cer -	a+c
	PA 755 /06	apis	cer -	a+c



a+c = Presencia de *N. apis* y *N. ceranae*; cer = Presencia de *N. ceranae*; apis = Presencia de *N. apis*.

Falso negativo.  Falso positivo.

**Tabla 4.1.6.** (Continuación) Detección de *N. ceranae* en 180 colmenas mediante PCR, inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando el anticuerpo policlonal (Pc) de conejo frente a *N. ceranae* y microscopía óptica (MO).

	NºREGISTRO	PCR	IFI (Pc)	MO
PCR = Negativa; n = 44	PA 167 /06	apis	cer -	-
	PA 1178 /06	-	cer -	apis
	PA 1176 /06	-	cer -	a+c
	PA 165 /06	-	cer -	-
	PA 171 /06	-	cer -	-
	PA 172 /06	-	cer -	-
	PA 173 /06	-	cer -	-
	PA 174 /06	-	cer -	-
	PA 177 /06	-	cer -	-
	PA 178 /06	-	cer -	-
	PA 189 /06	-	cer -	-
	PA 190 /06	-	cer -	-
	PA 191 /06	-	cer -	-
	PA 192 /06	-	cer -	-
	PA 193 /06	-	cer -	-
	PA 194 /06	-	cer -	-
	PA 195 /06	-	cer -	-
	PA 196 /06	-	cer -	-
	PA 197 /06	-	cer -	-
	PA 199 /06	-	cer -	-
	PA 200 /06	-	cer -	-
	PA 202 /06	-	cer -	-
	PA 203 /06	-	cer -	-
	PA 204 /06	-	cer -	-
	PA 205 /06	-	cer -	-
	PA 208 /06	-	cer -	-
	PA 210 /06	-	cer -	-
	PA 211 /06	-	cer -	-
	PA 213 /06	-	cer -	-
	PA 214 /06	-	cer -	-
	PA 217 /06	-	cer -	-
	PA 293 /06	-	cer -	-
	PA 294 /06	-	cer -	-
	PA 298 /06	-	cer -	-
	PA 299 /06	-	cer +	-
	PA 303 /06	-	cer -	-
	PA 304 /06	-	cer -	-
	PA 307 /06	-	cer -	-
	PA 346 /06	-	cer -	-
	PA 350 /06	-	cer -	-
	PA 352 /06	-	cer -	-
	PA 353 /06	-	cer -	-
	PA 354 /06	-	cer -	-
	PA 355 /06	-	cer -	-
	PA 1008 /06	-	cer -	-

a+c = Presencia de *N. apis* y *N. ceranae*; cer = Presencia de *N. ceranae*; apis = Presencia de *N. apis*.

 Falso negativo.  Falso positivo.

Dichos resultados mostraron que, con la IFI, 93 colmenas (51,6 %) fueron positivas y 87 (48,3 %) negativas para la presencia de esta especie (Tabla 4.1.6.). En cuanto a los resultados obtenidos con la PCR múltiple, estos revelaron 94 colmenas (52,2 %) positivas para la infección por *N. ceranae*, sola o junto a *N. apis*, frente a 86 colmenas (47,8 %) negativas (Tabla 4.1.7.).

Estos porcentajes se corresponden con unos resultados en los que la IFI utilizando el anticuerpo policlonal reveló 5 falsos negativos (2,7%) y 4 falsos positivos (2,2 %) con respecto a la técnica de PCR (Tabla 4.1.6. y 4.1.8.).

**Tabla 4.1.7.** Resultados de la detección de *N. ceranae* en 180 colmenas mediante PCR, mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando el anticuerpo policlonal (Pc) y mediante microscopía óptica (MO).

	PCR	IFI (Pc)	MO
<b>Nº positivos (%)</b>	94 (52,2)	93 (51,6)	90 (50)
<b>Nº negativos (%)</b>	86 (47,8)	87 (48,3)	90 (50)

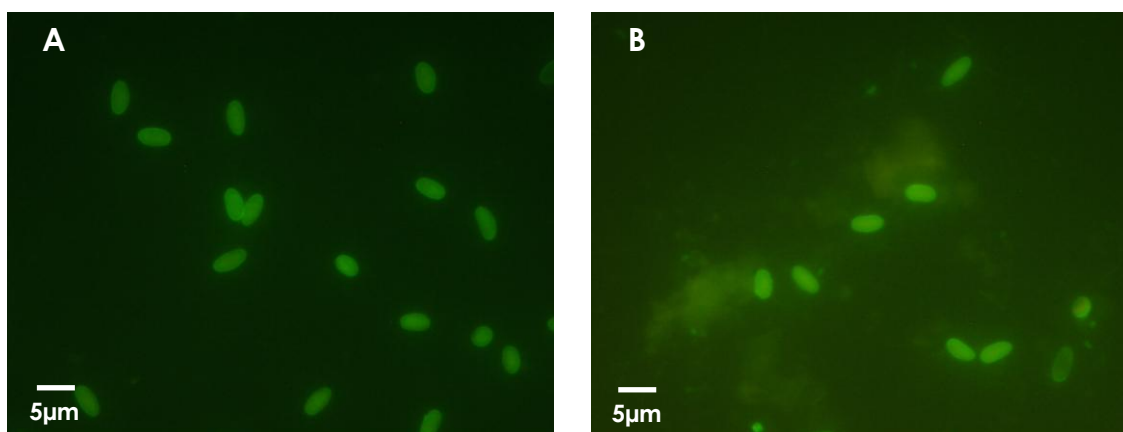
Teniendo en cuenta la presencia de *N. ceranae* como resultado positivo, los resultados obtenidos por la MO revelaron la infección por esta especie en 90 colmenas, el 50% de las totales (Tabla 4.1.7.). En este caso, la MO mostró 11 falsos negativos (6,1%) y 7 falsos positivos (3,8 %) con respecto a la PCR múltiple (Tabla 4.1.8.).

**Tabla 4.1.8.** Resumen de los falsos positivos y negativos obtenidos por la inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando el anticuerpo policlonal así como por microscopía óptica (MO).

ANTICUERPO	RESULTADO	TÉCNICA DIAGNÓSTICA	
		IFI	MO
<b>Policlonal</b>	FN (%)	5 (2,7)	11 (6,1)
	FP (%)	4 (2,2)	7 (3,8)

FN = Falsos negativos; FP = Falsos positivos.

**Figura 4.1.** Reacción del suero policlonal C1SM (dilución 1/1600) frente a **A:** Control positivo con esporas de *N. ceranae*; **B:** Esporas de *N. ceranae* detectadas en la colmena PA 1026/06.



#### 4.1.1.5. Análisis estadístico de los resultados.

Se realizó un estudio comparativo de la técnica de IFI desarrollada utilizando el suero policlonal de conejo frente a *N. ceranae* (apartado 3.1.2.6.), con las técnicas de microscopía óptica (MO) y la PCR múltiple (Martin-Hernandez y col., 2007). Cabe destacar que dicho estudio comparativo reveló diferencias entre las distintas técnicas diagnósticas. Para determinar la significación de esas diferencias, se realizó un análisis de concordancia (*Kappa* de Cohen) y una comparación de proporciones mediante *Chi* cuadrado.

En primer lugar se compararon los resultados de la IFI con el suero policlonal frente a *N. ceranae* con los obtenidos en el CAR utilizando la PCR múltiple para el diagnóstico de las 180 colmenas estudiadas. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla de contingencia (Tabla 4.1.9.) teniendo en cuenta que las muestras positivas se corresponden con colmenas infectadas sólo por *N. ceranae* o coinfectando con *N. apis*:

**Tabla 4.1.9.** Tabla de contingencia: PCR frente a IFI con anticuerpo policlonal (Pc).

		IFI (Pc)		TOTAL
		-	+	
PCR	-	82	4	86
	+	5	89	94
TOTAL		87	93	180

+ = Presencia de *N. ceranae*.

La comparación de las dos técnicas arrojó resultados similares coincidiendo en el diagnóstico de 171 colmenas: 82 negativas y 89 positivas. El análisis estadístico mediante *Chi* cuadrado mostró una correlación muy elevada (valor de *Chi* = 145,77 con  $p \leq 0,05$ ). Así mismo,

la fuerza de la concordancia (índice de Concordancia [ $\kappa = 0,9$ ]) presentó una valoración muy buena según la escala de valoración de éste índice (Tabla 4.1.10.) elaborada por Altman (1991).

**Tabla 4.1.10.** Escala de valoración del Índice de Kappa (Altman, 1991).

Valor de $\kappa$	Fuerza de la concordancia
<0.20	Pobre
0.21-0.40	Débil
0.41-0.60	Moderada
0.61-0.80	Buena
0.81-1.00	Muy buena

Al comparar los resultados de la microscopía óptica con los de la técnica de la PCR múltiple realizando el mismo análisis, se obtuvo la siguiente tabla de contingencia (Tabla 4.1.11.):

**Tabla 4.1.11.** Tabla de contingencia: PCR frente a MO.

		MO		TOTAL
		-	+	
PCR	-	79	7	86
	+	11	83	94
TOTAL		90	90	180

+ = Presencia de *N. ceranae*.

En la comparación del microscopio óptico con la PCR (Tabla 4.1.11.), el número de colmenas en el que ambas técnicas coincidieron es menor: 162 (79 positivas y 83 negativas). Se observó una correlación significativa al analizar los resultados utilizando la prueba de *Chi* cuadrado (valor de *Chi* = 115,428,  $p \leq 0,05$ ) y un Índice de Concordancia  $\kappa = 0,8$ , lo que en la escala de Altman (1991) se relaciona con una concordancia buena (Tabla 4.1.10.).

#### **a) Especificidad y sensibilidad de la técnica de IFI con los anticuerpos policlonales frente a *N. ceranae*.**

Una vez comparados los resultados de las técnicas de diagnóstico, se valoró la eficacia de la técnica de IFI desarrollada en la presente Tesis Doctoral. Para ello se determinaron sus parámetros de sensibilidad y especificidad. Se entendió por sensibilidad la proporción de verdaderos positivos identificados por la IFI frente al total de colmenas infectadas, y por

especificidad la proporción de verdaderos negativos del total colmenas sin infectar (Molinero, 2002). Para el estudio se tomó como patrón de oro la técnica de referencia: PCR múltiple.

Para el estudio comparativo mediante el Test Diagnóstico se analizaron los resultados obtenidos en las tablas de contingencia (Tablas 4.1.9. y 4.1.11.) de los estudios comparativos entre las distintas técnicas: la IFI utilizando el suero policlonal, la PCR múltiple descrita por el CAR y la MO con contraste de fases.

Al calcular la sensibilidad y la especificidad de la técnica de IFI utilizando el suero policlonal frente a *N. ceranae* con respecto a la sensibilidad y especificidad de la PCR múltiple, se observaron elevados porcentajes de similitud entre ambas técnicas (Tabla 4.1.12.).

**Tabla 4.1.12.** Porcentajes de sensibilidad y especificidad (Intervalo de Confianza) del Test Diagnóstico comparando la PCR frente a la MO y la IFI con el anticuerpo policlonal frente a *N. ceranae* (Nivel de confianza del 95%).

	PCR	IFI Policlonal	MO
<b>% Sensibilidad</b>	100	94,68 (89,61-99,75)	88,30 (81,27-95,33)
<b>% Especificidad</b>	100	95,35 (90,32-100)	91,86 (85,50-98,22)

Así mismo, se realizó un análisis similar para calcular la sensibilidad y la especificidad de la microscopía óptica con contraste de fases (MO), y así poder compara éstas con las de la IFI. Los porcentajes de sensibilidad y especificidad del microscopio con contraste de fases con respecto a la PCR múltiple resultaron más bajos que los obtenidos por la IFI (Tabla 4.1.12.), dato que cabía esperar a la vista de los resultados obtenidos en los estudios comparativos con las tablas de contingencia (Tablas 4.1.9. y 4.1.11.).

#### **4.2. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A *N. ceranae*.**

##### **4.2.1. OBTENCIÓN DE ANTÍGENO SOLUBLE DE ESPORA. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEINAS.**

Siguiendo el método para la obtención de antígeno soluble de espora desarrollado por del Águila y col. (2001) y descrito previamente en el apartado 3.2.2.2., a partir de una cantidad inicial de  $10^8$  esporas totales de *N. ceranae* se obtuvieron 93,39 µg de proteína total, determinada mediante el método de Bradford.

Debido al elevado gasto de esporas que requería la obtención de antígeno soluble y a la escasa utilidad de éste para su utilización en el ELISA (apartado 4.2.3.1.), no se realizaron más lotes de extracción.

## 4.2.2. INMUNIZACIÓN Y SANGRADO DEL MODELO ANIMAL.

### 4.2.2.1. Titulación de sueros policlonales.

Para estudiar la evolución de los títulos de anticuerpos durante el protocolo de inmunización, se realizaron estudios mediante IFI de los sueros obtenidos en las sangrías del lote de ratones destinados a las fusiones (apartado 3.2.2.3.a.2.). Todos los sueros se titularon frente a *N. apis* y *N. ceranae*, para detectar posibles reacciones cruzadas entre ambas especies.

#### a) IFI para la titulación de los sueros policlonales.

Los antisueros policlonales obtenidos en cada una de las sangrías realizadas se titularon utilizando la técnica de IFI descrita en el apartado 3.2.2.3.a.2.1. Se utilizaron diluciones dobles seriadas de los mismos, partiendo de la 1/25 hasta la 1/3200.

En la Tabla 4.2.1. y en la Figura 4.2 se muestran los títulos de los antisueros obtenidos de los ratones inmunizados frente a *N. ceranae*, y cómo éstos fueron aumentando a lo largo del periodo de inmunización hasta llegar a un máximo de 3200 en la cuarta sangría (S4).

**Tabla 4.2.1.** Resultados de la titulación de los sueros obtenidos del lote de ratones inmunizados con *N. ceranae*.

Sangría	Antígeno	DILUCIONES								
		1/25	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400
S0	<i>N. ceranae</i>	-	-	-	-	-	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.
	<i>N. apis</i>	-	-	-	-	-	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.
S1	<i>N. ceranae</i>	++	++	++	+	+	-	N.R.	N.R.	N.R.
	<i>N. apis</i>	-	-	-	-	-	-	N.R.	N.R.	N.R.
S2	<i>N. ceranae</i>	N.R.	N.R.	+++	+++	++	+	+/-	-	N.R.
	<i>N. apis</i>	N.R.	N.R.	-	-	-	-	-	-	N.R.
S3	<i>N. ceranae</i>	N.R.	N.R.	N.R.	++	++	+/-	+/-	-	N.R.
	<i>N. apis</i>	N.R.	N.R.	N.R.	+	+	+	+	+	-
S4	<i>N. ceranae</i>	N.R.	N.R.	N.R.	++	++	++	++	+	-
	<i>N. apis</i>	N.R.	N.R.	N.R.	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-

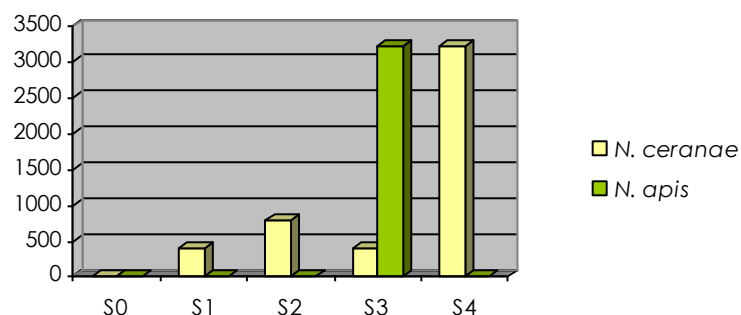
+++=Fluorescencia fuerte; ++=Fluorescencia moderada; +=Fluorescencia débil; +/-=Fluorescencia débil, no en todas las esporas; N.R.= No realizado.

Hay que mencionar la presencia de reacción cruzada frente a *N. apis* a partir de la tercera sangría (S3), reacción que, a pesar de no ser intensa, dio lugar a un título de 3200 por



encima del presentado frente a *N. ceranae* (400). Sin embargo, en la última sangría (S4) la intensidad de esta reacción frente a *N. apis* disminuyó hasta el punto de no afectar a todas las esporas del tapizado, por lo que no se consideró un título.

**Figura 4.2.** Evolución del título de anticuerpos frente al tiempo.



Una vez finalizado el protocolo de inoculación, y para mantener elevado el título de anticuerpos antes de la fusión, se administraron dosis de recuerdo. Dada la dificultad en la obtención de esporas, estas dosis sólo se pudieron inocular a la mitad de los ratones del lote de inmunización. En la Tabla 4.2.2. se muestra la distinta evolución de los títulos séricos en los ratones con y sin dosis de recuerdo.

**Tabla 4.2.2.** Resultados de la titulación de los sueros obtenidos tras la administración de la dosis de recuerdo o sin ella.

Sangría	Recuerdo	Antígeno	DILUCIONES					
			1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400
S5	Con	<i>N. ceranae</i>	+++	+++	++	+	+/-	-
		<i>N. apis</i>	+	+	+	+	+/-	-
	Sin	<i>N. ceranae</i>	+	+	+/-	+/-	-	-
		<i>N. apis</i>	+	+	+/-	+/-	+/-	-

+++=Fluorescencia fuerte; ++=Fluorescencia moderada; +=Fluorescencia débil; +/-=Fluorescencia débil, no en todas las esporas; N.R.= No realizado.

En el caso de los ratones con recuerdo se alcanzó un título de 1600 frente a *N. ceranae*, obteniendo una buena fluorescencia hasta la dilución 1/800. En contraste con estos resultados, el grupo de ratones sin dosis de recuerdo sólo alcanzó un título de 400 y con una fluorescencia débil en todas las diluciones probadas.

En cuanto a la presencia de reacciones cruzadas frente a *N. apis*, los ratones con dosis de recuerdo mostraron una fluorescencia débil, que alcanzó un título de 1600. La fluorescencia que presentó el grupo sin recuerdo frente a *N. apis*, también débil, alcanzó un título de 400.

#### **4.2.3. PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES *in vitro*.**

##### **4.2.3.1. Fusiones celulares.**

La semana antes de cada fusión celular, el cultivo de mieloma se mantenía en crecimiento exponencial, y el día en el que se realizaba dicha fusión se calculaba su concentración. En cada fusión, la obtención de esplenocitos se realizó a partir del bazo de un ratón procedente del lote de ratones inmunizados con esporas de *N. ceranae*, a los que además se les había inoculado una dosis de recuerdo. Una vez finalizada la fusión celular siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.2.2.3.b.3. se calculó la viabilidad celular, se ajustó la concentración y se mantuvo en la estufa hasta el día siguiente.

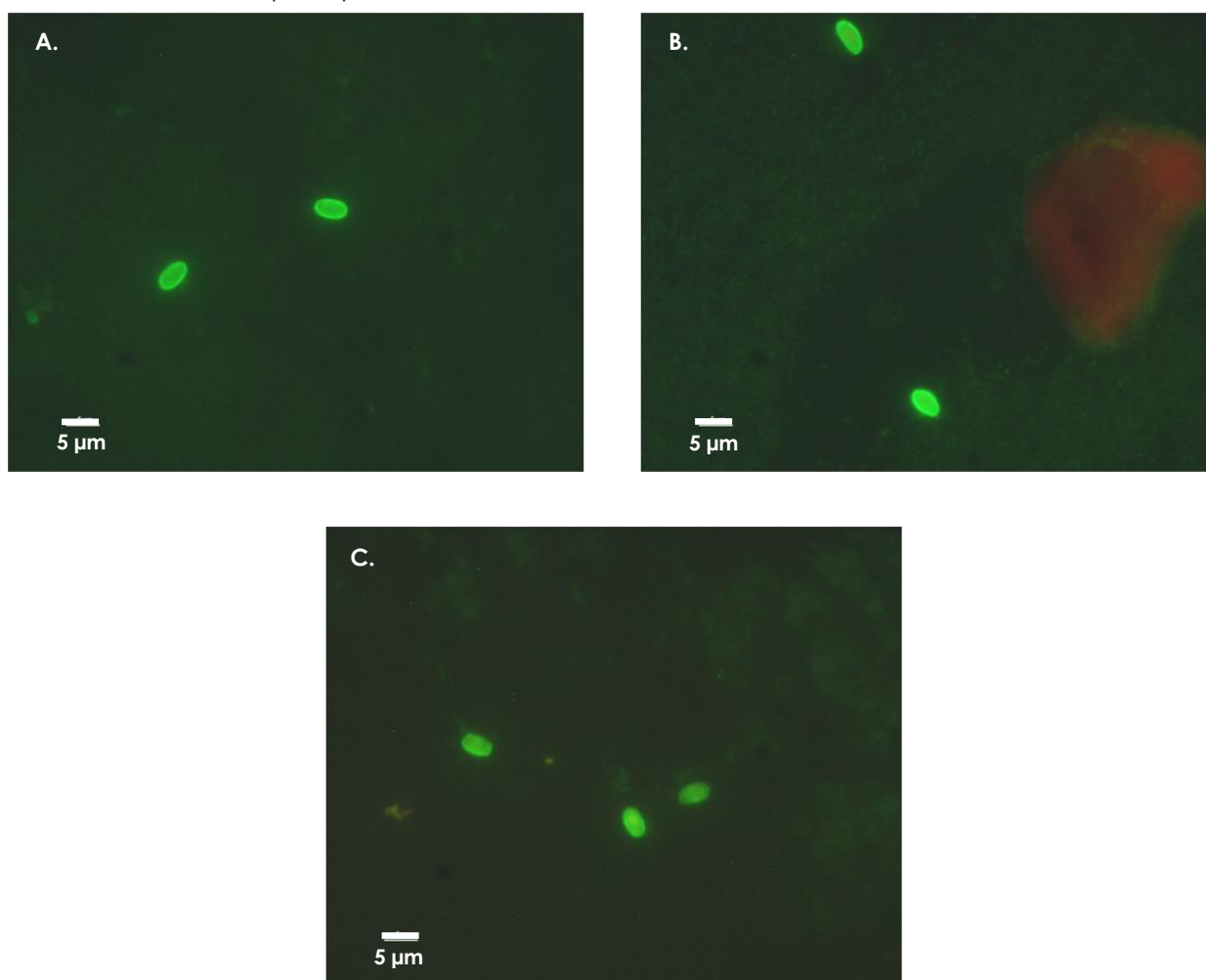
A las 24 horas se volvió a realizar un recuento celular para calcular la viabilidad y ajustar la concentración. Posteriormente, el producto de la fusión se distribuyó en placas de cultivo de 96 pocillos, preparadas previamente con timocitos (apartado 3.2.2.3.b.2.) en medio completo con HAT para la selección de hibridomas.

Los hibridomas se mantuvieron en medio selectivo (RPMI-HAT) aproximadamente durante quince días, a partir de los cuales no se observaban células vivas en los controles de mieloma y de bazo. Como paso previo al mantenimiento de los hibridomas en medio completo, éstos se mantuvieron en medio RPMI con HT.

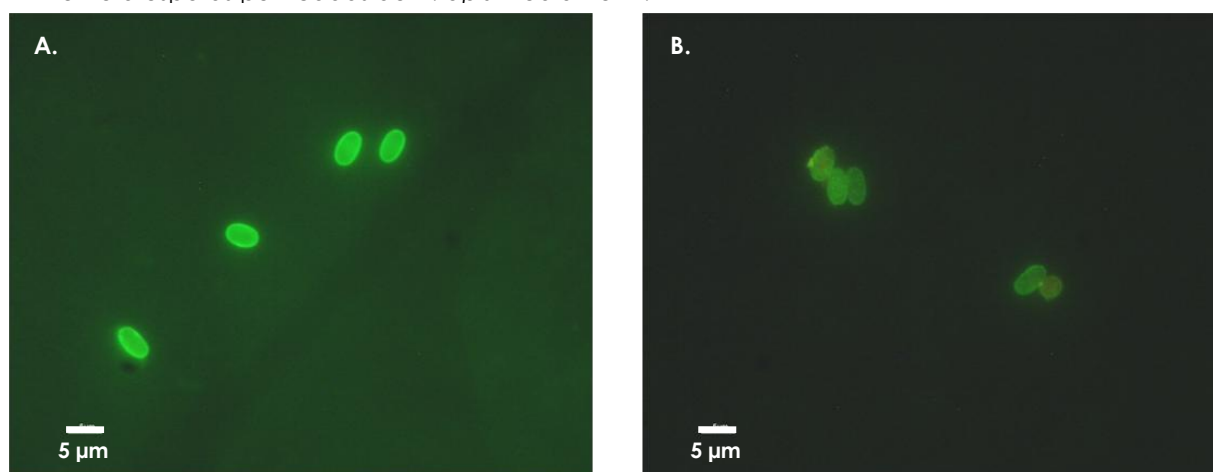
Dado que la prueba de ELISA llevada a cabo no ofreció unos resultados que permitieran el cribado de los híbridos productores, los sobrenadantes se estudiaron mediante IFI, empleando como antígeno espора completa de *N. ceranae* y *N. apis*, de modo que los híbridos positivos (productores de anticuerpos específicos) se seleccionaron para su clonaje (apartado 3.2.2.3.b.5.) y posterior caracterización (apartado 3.3.).

En la Tabla 4.2.3. están recogidos los resultados de las seis fusiones celulares realizadas. Los porcentajes de viabilidad a las 24 horas de fusión se mantuvieron entre el 33,3 % y el 57,1 %, con un porcentaje de crecimiento mínimo del 72 % y hasta un máximo del 99,3 %. De las seis fusiones se obtuvo un número total de 3050 híbridos, de los cuales 442 (el 14,5 %) resultaron positivos en el estudio mediante IFI. De todos ellos se seleccionaron cuatro para su posterior clonación y caracterización: dos productores de anticuerpos específicos frente a *N. ceranae* (F1. 7D2 y F4. 1B11), uno frente a *N. apis* (F4. 9G2) y otro que reconoce las dos especies simultáneamente (F1. 6F10) (Figuras 4.3. y 4.4.).

**Figura 4.3.** Reacción de los sobrenadantes (sin diluir) de los hibridomas **A:** F1. 6F10, **B:** F1. 7D2 y **C:** F4. 1B11 frente a esporas purificadas de *N. ceranae* mediante IFI.



**Figura 4.4.** Reacción de los sobrenadantes (sin diluir) de los hibridomas **A:** F1. 6F10 y **B:** F4. 9G2 frente a esporas purificadas de *N. apis* mediante IFI.



**Tabla 4.2.3.** Resultados obtenidos en las Fusiones Celulares.

	FUSIÓN 1	FUSIÓN 2	FUSIÓN 3	FUSIÓN 4	FUSIÓN 5	FUSIÓN 6
<b>Concentración de mieloma</b>	1,8x10 <sup>6</sup> céls./ml	9x10 <sup>5</sup> céls./ml	1,8x10 <sup>6</sup> céls./ml	1,7x10 <sup>6</sup> céls./ml	3,1x10 <sup>6</sup> céls./ml	1,7x10 <sup>6</sup> céls./ml
<b>Células totales de mieloma</b>	7,2x10 <sup>7</sup> céls.	3,6x10 <sup>7</sup> céls.	7,2x10 <sup>7</sup> céls.	6,8x10 <sup>7</sup> céls.	1,24x10 <sup>8</sup> céls.	6,8x10 <sup>7</sup> céls.
<b>Células totales de bazo</b>	1,7x10 <sup>8</sup> céls.	1,27x10 <sup>8</sup> céls.	1,79x10 <sup>8</sup> céls.	1,5x10 <sup>8</sup> céls.	2,43x10 <sup>8</sup> céls.	3,9x10 <sup>7</sup> céls.
<b>Relación mieloma-bazo (1:5)</b>	19ml:10ml	30ml:10ml	20ml:10ml	18ml:10ml	16ml:10ml	5ml:10ml
<b>Células totales de híbrido</b>	5,6x10 <sup>7</sup> céls.	2,20x10 <sup>6</sup> céls.	5,6x10 <sup>7</sup> céls.	9,6x10 <sup>7</sup> céls.	6,3x10 <sup>6</sup> céls.	2,6x10 <sup>7</sup> céls.
<b>Viabilidad</b>	51,8 %	34,4 %	43 %	52,8 %	52 %	61,9 %
<b>Concentración de híbrido (24h)</b>	2,20x10 <sup>6</sup> céls./ml	1,2x10 <sup>6</sup> céls./ml	2,35x10 <sup>6</sup> céls./ml	2,7x10 <sup>6</sup> céls./ml	3,3x10 <sup>6</sup> céls./ml	1,3x10 <sup>6</sup> céls./ml
<b>Viabilidad (24h)</b>	33,3 %	57,1 %	46,5 %	45,7 %	55,9 %	43,3 %
<b>Total de híbridos obtenidos</b>	505	559	599	501	497	389
<b>Porcentaje de crecimiento</b>	84,1 %	93,2 %	99,83 %	83,5 %	82,8 %	72 %
<b>Número de híbridos positivos (IFI)</b>	71 (11,8 %)	59 (9,8 %)	133 (22,1 %)	117 (23,2 %)	25 (5,1 %)	37 (8,6 %)
<b>Híbridos seleccionados</b>	F1.6F10 y F1.7D2	-----	-----	F4.1B11 y F4.9G2	-----	-----

céls.=Células vivas.

#### 4.2.3.2. Clonaje de los híbridos seleccionados.

Los híbridos productores seleccionados se clonaron por dilución límite, como mínimo tres veces para garantizar su "monoclonalidad", asegurando que todas las células procedieran de una misma célula progenitora. La selección de los clones se realizó mediante la técnica de IFI (apartado 3.2.2.3.b.4.1.2.), y con preferencia por los híbridos procedentes de las placas con menores concentraciones de células (0,5 y 1 células/pocillo). Se congelaron varias alícuotas de cada clon.

En las tablas de la 4.2.4., 4.2.5., 4.2.6. y 4.2.7. se muestran los porcentajes de crecimiento celular y de híbridos positivos obtenidos en cada una de las placas, así como el número de clones congelados por cada híbrido y el seleccionado para el siguiente clonaje.

Hay que destacar que en el primer clonaje (Tabla 4.2.4.), los híbridos F4.1B11 y F4.9G2 presentaron un elevado porcentaje de positividad. Sin embargo estos híbridos se siguieron clonando para garantizar su "monoclonalidad", ya que no todos los clones que se seleccionaron procedían de las placas de menor concentración celular.

En algunos casos se dejó de clonar con porcentajes de híbridos positivos por debajo del 100%; sin embargo, estos porcentajes se corresponden con un solo híbrido negativo por placa (Tablas 4.2.4. y 4.2.6.).

**Tabla 4.2.4.** Resultados obtenidos en el 1<sup>er</sup> clonaje.

CONCENTRACIÓN PLACAS DE CLONAJE										
Híbrido	5 c/p		1 c/p		0,5 c/p		Nº de Clones conservados			Clon seleccionado
	%crec.	%pos.	%crec.	%pos.	%crec.	%pos.	5c/p	1c/p	0,5c/p	
F1.6F10	96,6	34,5	46,6	89,3	38,3	86,9	----	----	5	3E7
F1.7D2	80	62,5	25	53,3	21,6	69,2		2	8	3C4
F4.1B11	78,3	100	23,3	100	13,3	100	2	3	----	2D4
F4.9G2	93,3	98,21*	33,3	100	28,3	100	1	2	2	1F7

c/p = células por pocillo; %crec.= porcentaje de crecimiento en placa; % pos.= porcentaje de híbridos positivos.

\* = Sólo uno de los pocillos con crecimiento resultó negativo.

**Tabla 4.2.5.** Resultados obtenidos en el 2<sup>o</sup> clonaje.

CONCENTRACIÓN PLACAS DE CLONAJE										
Clon	5 c/p		1 c/p		0,5 c/p		Nº de Clones conservados			Clon seleccionado
	%rec.	%pos.	%rec.	%pos.	%rec.	%pos.	5c/p	1c/p	0,5c/p	
F1.6F10.3E7	63,3	89,5	33,3	85	18,3	54,5	4	2	----	1C3
F1.7D2.3C4	69,4	64	72,2	76,9	----	----	2	4	----	1D10
F4.1B11.2D4	51,6	87	16,6	70	11,6	100	----	3	----	3E8
F4.9G2.1F7	78,3	51,1	36,6	31,8	25	33,3	2	1	2	3B7

c/p = células por pocillo; %crec.= porcentaje de crecimiento en placa; % pos.= porcentaje de híbridos positivos.

Tabla 4.2.6. Resultados obtenidos en el 3<sup>er</sup> clonaje.

CONCENTRACIÓN PLACAS DE CLONAJE										
Clon	5 c/p		1 c/p		0,5 c/p		Nº de Clones conservados			Clon seleccionado
	%crec.	%pos.	%crec.	%pos.	%crec.	%pos.	5c/p	1c/p	0,5c/p	
F1.6F10.3E7.1C3	100	85	98,3	76,3	78,3	80,8	----		12	3G3
F1.7D2.3C4.1D10	73,3	97,7*	36,6	100	11,6	100	----	3	2	Estable
F4.1B11.2D4.3E8	100	98,3*	55	96,9*	36,6	100	----	2	2	Estable
F4.9G2.1F7.3B7	98,3	96,6	30	77,7	23,3	100	1	----	3	3B9

c/p = células por pocillo; %crec.= porcentaje de crecimiento en placa; % pos.= porcentaje de híbridos positivos.

\* = Sólo uno de los pocillos con crecimiento resultó negativo.

Tabla 4.2.7. Resultados obtenidos en el 4<sup>o</sup> clonaje.

Clon	CONCENTRACIÓN PLACAS DE CLONAJE						Nº de Clones conservados		
	5 c/p		1 c/p		0,5 c/p				
	%crec.	%pos.	%crec.	%pos.	%crec.	%pos.	5c/p	1c/p	0,5c/p
F1.6F10.3E7.1C3.3G3	41	96	8.3	100	10	83,3	2	1	1
F4.9G2.1F7.3B7.3B9	95	98,2	36,6	95,4	11,66	100	----	4	Estable

c/p = células por pocillo; %crec.= porcentaje de crecimiento en placa; % pos.= porcentaje de híbridos positivos.

#### 4.2.4. PRODUCCIÓN DE LÍQUIDO ASCÍTICO CON ANTICUERPOS MONOCLONALES.

Los anticuerpos monoclonales se produjeron *in vivo* según el protocolo descrito en (apartado 3.2.2.4.), inoculando a los distintos lotes de ratones con  $1,5-2 \times 10^6$  células de híbrido por ratón. El líquido ascítico extraído se congeló a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su posterior titulación mediante la técnica de IFI, cuyos resultados se presentan en el apartado 4.3.2.2. En la Tabla 4.2.8. se muestran las condiciones en las que se produjeron las ascitis, así como los volúmenes obtenidos para cada uno de los híbridos.

Durante el proceso de producción de ascitis, algunos ratones produjeron líquido ascítico, tumores sólidos o ambos a la vez, independientemente del híbrido con el que fueron inoculados.

Cuando el clon del híbrido F4.9G2 no produjo líquido ascítico en ninguno de los ratones del lote en el que se inoculó, dicho lote se volvió a inocular con otro clon del mismo híbrido. En éste caso sí que se pudo obtener ascitis de tres de los ratones del lote. En el caso del híbrido F4.1B11, éste no produjo líquido ascítico en ninguno de los ratones del lote, a pesar de que se probaron dos clones distintos de dicho híbrido.

**Tabla 4.2.8.** Condiciones de la producción de ascitis y volúmenes obtenidos.

CONDICIONES DE OBTENCIÓN DE LÍQUIDO ASCÍTICO						
Híbrido	Clon	Volumen Pristane	Inóculo híbrido*	Volumen híbrido	Animales que producen	VOLUMEN ASCITIS
<b>F1.6F10</b>	3E7	0,5 ml/ratón	1,7x10 <sup>6</sup>	1 ml/ratón	6	7,25 ml
<b>F1.7D2</b>	3C4.D10	0,5 ml/ratón	2x10 <sup>6</sup>	1 ml/ratón	2	5,2 ml
<b>F4.1B11</b>	2D4	0,5 ml/ratón	2x10 <sup>6</sup>	1 ml/ratón	0	-----
	1D7	0,5 ml/ratón	2x10 <sup>6</sup>	1 ml/ratón	0	-----
<b>F4.9G2</b>	1F7	0,5 ml/ratón	1,5x10 <sup>6</sup>	1 ml/ratón	0	-----
	3G3	0,5 ml/ratón	2x10 <sup>6</sup>	1 ml/ratón	3	9,45 ml

\* = Células totales

#### 4.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES OBTENIDOS FRENTE A *Nosema* *SPP.*

##### 4.3.1. ISOTIPADO DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES.

Para determinar los isotipos de las inmunoglobulinas secretadas por los híbridos, se utilizó el kit *Pierce® Rapid Isotyping Kit with Kappa and Lambda-Mouse*, según las especificaciones del fabricante. Después de incubar las cassetes del kit con los sobrenadantes saturados de cada híbrido, se observó que todos ellos producían anticuerpos del isotipo IgM de cadena ligera  $\kappa$ . En la Figura 5.1. se muestra un ejemplo.

**Figura 4.5.** Determinación del isotipo del anticuerpo monoclonal F4. 1B11 mediante el Kit de Isotipado *Pierce® Rapid Isotyping Kit with Kappa and Lambda-Mouse*. **C:** Control.



#### 4.3.2. TITULACIÓN DE SOBRENADANTES SATURADOS Y ASCITIS DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES.

Mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI), descrita en el apartado 3.2.2.3., se realizaron estudios encaminados a conocer de manera detallada la reactividad y especificidad de los anticuerpos monoclonales seleccionados: F1. 6F10, F1. 7D2, F4. 1B11 y F4. 9G2. Para ello se llevó a cabo la titulación tanto de los sobrenadantes saturados como de los líquidos ascíticos frente a las especies de *Nosema* que reconocen específicamente cada uno de ellos (Tabla 4.3.1.).

**Tabla 4.3.1.** Reactividad de los anticuerpos monoclonales frente a *N. apis* y *N. ceranae*.

AcMc	REACTIVIDAD	
	<i>N. apis</i>	<i>N. ceranae</i>
<b>F1. 6F10</b>	Si	Si
<b>F1. 7D2</b>	No	Si
<b>F4. 1B11</b>	No	Si
<b>F4. 9G2</b>	Si	No

AcMc = Anticuerpo Monoclonal.

##### 4.3.2.1. Titulación de los sobrenadantes saturados.

Dado que el anticuerpo monoclonal F1. 6F10 reaccionaba tanto frente a *N. ceranae* como a *N. apis*, se utilizaron ambas especies en la titulación del mismo. De igual modo, F1. 7D2 y F4. 1B11 se titularon frente a *N. ceranae* y F4. 9G2 frente a *N. apis*, sus respectivos antígenos reconocidos. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.3.2.

**Tabla 4.3.2.** Títulos obtenidos mediante IFI de los sobrenadantes saturados frente a *N. cerane* y *N. apis*.

AcMc	Especie	SD	DILUCIONES									
			1/5	1/10	1/15	1/20	1/25	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800
<b>F1. 6F10</b>	<b><i>N. ceranae</i></b>	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+/-	-
	<b><i>N. apis</i></b>	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+/-	+/-	-
<b>F1. 7D2</b>	<b><i>N. ceranae</i></b>	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	+/-	-
<b>F4. 1B11</b>	<b><i>N. ceranae</i></b>	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+/-	+/-	+/-	-
<b>F4. 9G2</b>	<b><i>N. apis</i></b>	++	+	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-	-

AcMc = Anticuerpo monoclonal; SD = Sin diluir; +++ = Fluorescencia fuerte; ++ = Fluorescencia moderada; + = Fluorescencia débil; +/- = Fluorescencia débil sólo en algunas esporas; - = Sin fluorescencia.



El anticuerpo monoclonal F1. 6F10 presentó una reactividad similar frente a *N. ceranae* y *N. apis*, con títulos de 200 y de 100 respectivamente, lo que hace de él un buen candidato como anticuerpo monoclonal de género. A su vez, los anticuerpos monoclonales F1. 7D2 y F4. 1B11 alcanzaron títulos de 200 y 50 respectivamente frente a *N. ceranae*. Finalmente el anticuerpo monoclonal F4. 9G2 presentó un título de 5 frente a *N. apis*, con ausencia de reactividad frente a *N. ceranae*.

#### 4.3.2.2. Titulación de los líquidos ascíticos.

Con la excepción del F1. 1B11, que no produjo ascitis, se titularon los líquidos ascíticos frente a las especies reconocidas por cada anticuerpo monoclonal. De nuevo se utilizó la técnica de IFI nombrada en el apartado anterior. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla (Tabla 4.3.3.):

**Tabla 4.3.3.** Títulos obtenidos mediante IFI de los líquidos ascíticos frente a *N. ceranae* y *N. apis*.

		DILUCIONES											
AcMc	Especie	25	50	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	51200
F1.6F10	<i>N. ceranae</i>	+++	+++	+++	++	++	++	++	+	+/-	-	-	-
	<i>N. apis</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+/-	+/-	-
F1.7D2	<i>N. ceranae</i>	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	+/-	+/-	-	-
F4.9G2	<i>N. apis</i>	++	++	+	+	+	+	+	+/-	+/-	-	-	-

AcMc = Anticuerpo monoclonal; +++ = Fluorescencia fuerte; ++ = Fluorescencia moderada; + = Fluorescencia débil; +/- = Fluorescencia débil sólo en algunas esporas; - = Sin fluorescencia.

Los resultados obtenidos muestran que el anticuerpo monoclonal F1. 6F10 presentó una mayor reactividad frente a *N. apis* (con un título de 6400) que frente a *N. ceranae* (título de 3200). La ascitis del anticuerpo monoclonal F1. 7D2 alcanzó un título de 3200 frente a *N. ceranae*, mientras que el anticuerpo monoclonal F4. 9G2 presentó un título de 1600 frente a *N. apis*.

#### 4.3.3. ESTUDIO DE REACCIONES CRUZADAS DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES.

##### 4.3.3.1. Reacciones cruzadas de los sobrenadantes saturados de los anticuerpos monoclonales.

En las Tablas 4.3.4., 4.3.5., 4.3.6. y 4.3.7. se muestra la reactividad que presentaron los sobrenadantes saturados de los anticuerpos monoclonales frente a *N. apis* y *N. ceranae*, así

como frente a otras especies de microsporidios tales como *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon cuniculi*, *Encephalitozoon intestinalis*, *Encephalitozoon hellem*, *Ancaliia algerae* y *Vittaforma corneae*.

**Tabla 4.3.4.** Reacciones cruzadas obtenidas mediante IFI del sobrenadante saturado del anticuerpo monoclonal F1. 6F10.

AcMc	Especie	SD	DILUCIONES					
			1/25	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800
F1. 6F10	<i>N. ceranae</i>	+++	++	+	+	+	+/-	-
	<i>N. apis</i>	+++	++	+	+	+/-	+/-	-
	<i>V. corneae</i>	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-
	<i>A. algerae</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>E. intestinalis</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>E. cuniculi</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>E. hellem</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>E. bieneusi</i>	-	-	-	-	-	-	-

AcMc = Anticuerpo monoclonal; SD = Sin diluir; +++ = Fluorescencia fuerte; ++ = Fluorescencia moderada; + = Fluorescencia débil; +/- = Fluorescencia débil sólo en algunas esporas; - = Sin fluorescencia.

El anticuerpo monoclonal F1. 6F10 solamente presentó reacción cruzada débil frente a *V. corneae* (Tabla 4.3.4.), reacción que no permitió la determinación de un título, ya que en ninguna de las diluciones afectaba al total de las esporas (+/-).

**Tabla 4.3.5.** Reacciones cruzadas obtenidas mediante IFI del sobrenadante saturado del anticuerpo monoclonal F1. 7D2.

AcMc	Especie	SD	DILUCIONES					
			1/25	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800
F1. 7D2	<i>N. ceranae</i>	++	++	++	++	+	+/-	-
	<i>N. apis</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>V. corneae</i>	+	-	-	-	-	-	-
	<i>A. algerae</i>	+	-	-	-	-	-	-
	<i>E. intestinalis</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>E. cuniculi</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>E. hellem</i>	+/-	-	-	-	-	-	-
	<i>E. bieneusi</i>	-	-	-	-	-	-	-

AcMc = Anticuerpo monoclonal; SD = Sin diluir; +++ = Fluorescencia fuerte; ++ = Fluorescencia moderada; + = Fluorescencia débil; +/- = Fluorescencia débil sólo en algunas esporas; - = Sin fluorescencia.

**Tabla 4.3.6.** Reacciones cruzadas obtenidas mediante IFI del sobrenadante saturado del anticuerpo monoclonal F4. 1B11.

AcMc	Especie	SD	DILUCIONES					
			1/25	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800
F4. 1B11	<i>N. ceranae</i>	+++	++	+	+/-	+/-	+/-	-
	<i>N. apis</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>V. corneae</i>	+/-	+/-	-	-	-	-	-
	<i>A. algerae</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>E. intestinalis</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>E. cuniculi</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>E. hellem</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>E. bieneusi</i>	-	-	-	-	-	-	-

AcMc = Anticuerpo monoclonal; SD = Sin diluir; +++ = Fluorescencia fuerte; ++ = Fluorescencia moderada; + = Fluorescencia débil; +/- = Fluorescencia débil sólo en algunas esporas; - = Sin fluorescencia.

En cuanto a los anticuerpos monoclonales F1. 7D2 y F4. 1B11, habría que destacar la ausencia de reacciones cruzadas frente a *N. apis* por parte de ambos (Tablas 4.3.5. y 4.3.6.). También se observó reacción cruzada débil frente a *V. corneae*, aunque no se pudo establecer un título para la misma, ya que o bien no afectaba a todas las esporas (F4. 1B11, Tabla 4.3.6.) o desaparecía en la primera dilución (F1. 7D2, Tabla 4.3.5.). Por otra parte, el sobrenadante saturado de F1. 7D2 reaccionó también frente a las esporas de *A. algerae* y *E. hellem*, pero en ambos casos dicha reacción fue de nuevo muy tenue, desapareciendo con la primera dilución (Tabla 4.3.5.).

**Tabla 4.3.7.** Reacciones cruzadas obtenidas mediante IFI del sobrenadante saturado del anticuerpo monoclonal F4. 9G2.

AcMc	Especie	SD	DILUCIONES					
			1/5	1/10	1/15	1/20	1/25	1/50
F4. 9G2	<i>N. apis</i>	++	+	+/-	+/-	+/-	+/-	-
	<i>N. ceranae</i>	+	-	-	-	-	-	-
	<i>V. corneae</i>	+/-	+/-	-	-	-	-	-
	<i>A. algerae</i>	+	-	-	-	-	-	-
	<i>E. intestinalis</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>E. cuniculi</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>E. hellem</i>	+/-	-	-	-	-	-	-
	<i>E. bieneusi</i>	-	-	-	-	-	-	-

AcMc = Anticuerpo monoclonal; SD = Sin diluir; +++ = Fluorescencia fuerte; ++ = Fluorescencia moderada; + = Fluorescencia débil; +/- = Fluorescencia débil sólo en algunas esporas; - = Sin fluorescencia.

En último lugar, el sobrenadante del anticuerpo monoclonal F4. 9G2 sí que presentó reacción cruzada frente a *N. ceranae* cuando se estudió sin diluir, pero dicha reacción desapareció con la primera dilución del mismo (Tabla 4.3.7.). La IFI mostró también reacciones cruzadas con *V. corneae*, *A. algerae* y *E. hellem*, pero al igual que en los casos anteriores, no se pudo establecer un título dado que estas eran débiles, y sólo se mantenían después de la primera dilución en el caso de *V. corneae*.

#### 4.3.3.2. Reacciones cruzadas de los líquidos ascíticos de los anticuerpos monoclonales.

Al igual que con los sobrenadantes saturados, se estudiaron las posibles reacciones cruzadas de los líquidos ascíticos obtenidos frente a esporas de otras especies de microsporidios: *E. bieneusi*, *E. cuniculi*, *E. intestinalis*, *E. hellem*, *A. algerae* y *V. corneae*, así como *N. apis* y *N. ceranae*. En las tablas 4.3.8., 4.3.9. y 4.3.10. se muestran las reacciones cruzadas obtenidas y comparadas con la reactividad que presentaron frente *N. apis* y *N. ceranae*.

**Tabla 4.3.8.** Reacciones cruzadas obtenidas mediante IFI del líquido ascítico del AcMc F1.6F10.

AcMc	Especie	DILUCIONES											
		25	50	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	51200
F1.6F10	<i>N. ceranae</i>	+++	+++	+++	++	++	++	++	+	+/-	-	-	-
	<i>N. apis</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+/-	+/-	-
	<i>V. corneae</i>	++	++	+	+	+	+	+/-	+/-	-	-	-	-
	<i>A. algerae</i>	++	++	++	+	+	+/-	-	-	-	-	-	-
	<i>E. intestinalis</i>	++	+	+	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-
	<i>E. cuniculi</i>	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>E. hellem</i>	++	++	+	+	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-
	<i>E. bieneusi</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

AcMc = Anticuerpo monoclonal; +++ = Fluorescencia fuerte; ++ = Fluorescencia moderada; + = Fluorescencia débil; +/- = Fluorescencia débil sólo en algunas esporas; - = Sin fluorescencia.

El líquido ascítico del anticuerpo monoclonal F1. 6F10 (Tabla 4.3.8.) no presentó reacción cruzada frente a *E. bieneusi*. Sí que la presentó frente a *E. cuniculi*, pero ésta no pudo titularse debido a que en ningún caso afectaba al total de las esporas. Frente al resto de las especies utilizadas, la ascitis de F1. 6F10 presentó reacciones cruzadas de distinta intensidad: con *E. intestinalis* se alcanzó un título de 100, 200 con *E. hellem*, 400 con *A. algerae* y 800 *V. corneae*.

**Tabla 4.3.9.** Reacciones cruzadas obtenidas mediante IFI del líquido ascítico del AcMc F1.7D2.

AcMc	Especie	DILUCIONES											
		25	50	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	51200
F1.7D2	<i>N. ceranae</i>	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	+/-	+/-	-	-
	<i>N. apis</i>	++	++	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>V. corneae</i>	+	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>A. algerae</i>	+	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>E. intestinalis</i>	+	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>E. cuniculi</i>	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>E. hellem</i>	+	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>E. bieneusi</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

AcMc = Anticuerpo monoclonal; +++ = Fluorescencia fuerte; ++ = Fluorescencia moderada; + = Fluorescencia débil; +/- = Fluorescencia débil sólo en algunas esporas; - = Sin fluorescencia.

En el caso del líquido ascítico de F1. 7D2 (Tabla 4.3.9.), este presentó reacción cruzada frente a *N. apis* con un título de 100, muy por debajo del alcanzado frente a *N. ceranae* (3200). No se encontró reacción cruzada frente a *E. bieneusi*, pero sí frente al resto de las especies de microsporidio estudiadas. La reacción frente a *V. corneae* y *A. algerae* alcanzó un título de 25, mientras que la de *E. intestinalis* y *E. hellem* se observó hasta la dilución 1/50.

**Tabla 4.3.10.** Reacciones cruzadas obtenidas en IFI del líquido ascítico del AcMc F1.9G2.

Híbrido	Antígeno	DILUCIONES											
		25	50	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	51200
F4.9G2	<i>N. apis</i>	++	++	+	+	+	+	+	+/-	+/-	-	-	-
	<i>N. ceranae</i>	++	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>V. corneae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>A. algerae</i>	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>E. intestinalis</i>	+	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>E. cuniculi</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>E. hellem</i>	++	++	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>E. bieneusi</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

AcMc = Anticuerpo monoclonal; +++ = Fluorescencia fuerte; ++ = Fluorescencia moderada; + = Fluorescencia débil; +/- = Fluorescencia débil sólo en algunas esporas; - = Sin fluorescencia.

Finalmente, el líquido ascítico del anticuerpo monoclonal F4. 9G2 (Tabla 4.3.10.) mostró un título de 50 frente a *N. ceranae*, una reacción cruzada de poca intensidad si se considera el título presentado frente a su homólogo *N. apis* (1600). No se detectaron reacciones cruzadas frente a *V. corneae*, *E. cuniculi* o *E. bieneusi*. Sin embargo, la ascitis de F4. 9G2 sí que reaccionó

frente a *A. algerae*, *E. intestinalis* y *E. hellem*. En el caso de la reacción frente a *A. algerae*, está no afectó a todas las esporas y no pudo titularse. Frente a *E. intestinalis* y *E. hellem* alcanzó títulos de 25 y 100 respectivamente.

#### 4.3.4. OBTENCIÓN DE ANTÍGENO SOLUBLE DE ESPORA. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO PROTEICO.

Para optimizar el rendimiento en la obtención de antígeno soluble de espora, se realizaron modificaciones del método descrito previamente en el apartado 3.2.2.2, concretamente en las condiciones de velocidad y tiempo de agitación a las que se sometieron las suspensiones de esporas. En la Tabla 4.3.11. se presentan tanto los cambios realizados en el protocolo como los resultados obtenidos con los mismos, partiendo en todos los casos de la misma cantidad de esporas:  $10^8$ .

**Tabla 4.3.11.** Distintos protocolos de obtención de antígeno soluble y resultados de los mismos.

MÉTODO	CONDICIONES AGITACIÓN	[Ag] OBTENIDA
Águila y col., 2001a	5 batidas* (t = 45 s; v = 6.5 m/s)	155,66 µg/ml
Modificación 1	4 series de 3 batidas* (t = 45 s; v = 6.5 m/s)	368,85 µg/ml
Modificación 2	10 batidas* (t = 60 s; v = 6.5 m/s)	75 µg/ml

\*Entre batidas se dejó enfriar diez minutos en baño de hielo; t = Tiempo; v = Velocidad.

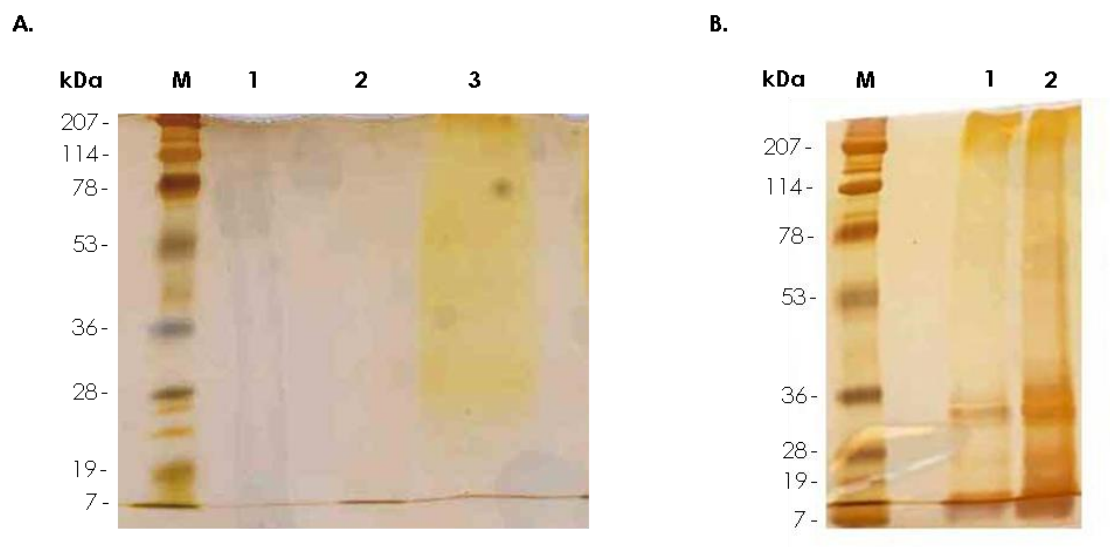
#### 4.3.5. CARACTERIZACIÓN ANTIGÉNICA DE *N. ceranae* Y *N. apis* MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (12 – 15 %, SDS-PAGE).

##### 4.3.5.1. Perfil proteico de *N. ceranae*.

Para determinar las condiciones óptimas de la electroforesis, se probaron tanto el antígeno soluble de espora de *N. ceranae* a distintas concentraciones (0,6; 0,8; 1; 5 y 10 µg por pocillo), así como distintas cantidades de espora completa por calle ( $10^5$ ,  $10^6$ ,  $0,25 \times 10^7$ ,  $0,5 \times 10^7$  y  $1 \times 10^7$  esporas totales por calle) como se describió anteriormente en el apartado 3.3.2.6.a.

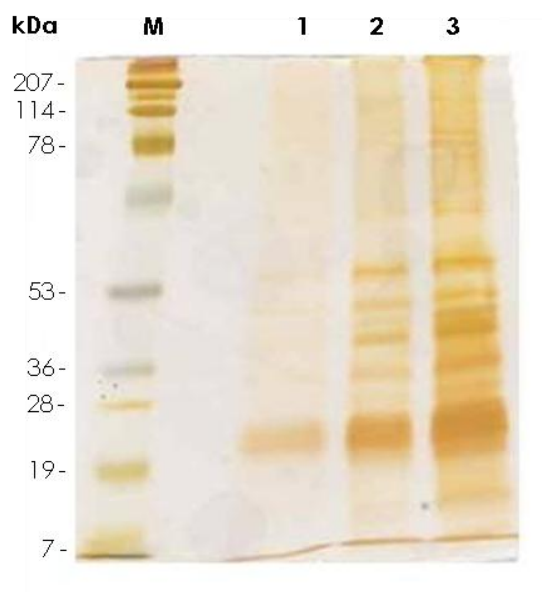
El análisis comparativo de los distintos perfiles proteicos obtenidos con antígeno soluble (Figura 5.2.) reveló que ninguna de las concentraciones empleadas permitía la obtención de un perfil completo, mostrando sólo las bandas de bajo peso molecular. Estos perfiles incompletos, con ausencia de las bandas de alto peso molecular, no permitieron una caracterización antigénica óptima y ni completa.

**Figura 4.6.** Perfil proteico de *N. ceranae* revelado mediante tinción de plata (SDS-PAGE al 12 %) utilizando antígeno soluble de espora. **M:** Marcador de peso molecular (rango 207 - 7 kDa). **A:** Calle 1: 0,6 µg, Calle 2: 0,8 µg y Calle 3: 1 µg. **B:** Calle 1: 5 µg y Calle 2: 10 µg.



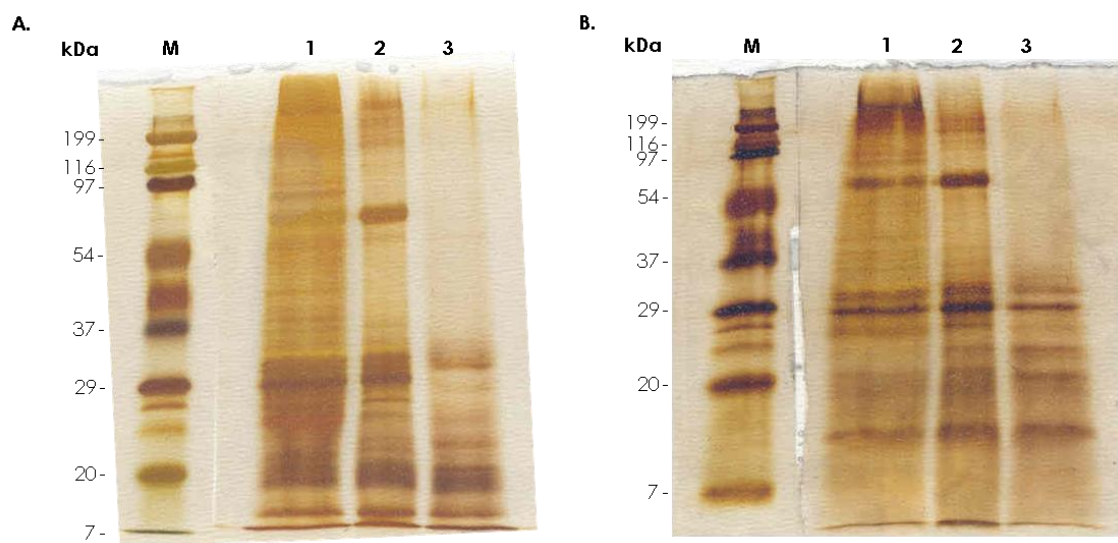
En el caso de la espora completa (Figura 5.3.), sólo la concentración más alta de todas las que se utilizaron ( $1 \times 10^7$ ) permitió la observación del perfil proteico del extracto de espora completa, pudiéndose visualizar bandas proteicas con un amplio rango de pesos moleculares, que fueron desde los 14 hasta los 134 kDa (Tabla 4.3.12.). Para garantizar una caracterización antigénica completa, se eligió dicho antígeno y a dicha concentración en todos los estudios realizados en adelante.

**Figura 4.7.** Perfil proteico de *N. ceranae* revelado mediante tinción de plata (SDS-PAGE al 15 %) utilizando extracto de espora completa. **M:** Marcador de peso molecular (rango 207 - 7 kDa). Calle 1:  $0,25 \times 10^7$  esporas, Calle 2:  $0,5 \times 10^7$  esporas y Calle 3:  $1 \times 10^7$  esporas.



Una vez determinado el tipo de antígeno (espora completa) y su concentración de uso ( $1 \times 10^7$ ), se evaluaron distintos tratamientos de la suspensión de esporas (apartado 3.3.2.6.a.) para determinar con cuál de ellos se obtenía el perfil proteico con un mayor rango de pesos moleculares. Los tratamientos estudiados fueron los descritos en el apartado 3.2.2.6.a.: El tratamiento de del Águila y col., 2001b con SDS-Urea, el tratamiento de Laemmli (1970) y el tratamiento con NuPAGE® (Tabla 3.3.2.).

**Figura 4.8.** Perfiles proteicos de *N. ceranae* obtenidos con los distintos tratamientos y revelados mediante tinción de plata. **A:** SDS-PAGE 12 %. **B:** SDS-PAGE 15 %. **M:** Marcador de peso molecular (rango 199 - 7 kDa), Calle **1:** NuPAGE®, Calle **2:** Laemmli (1970) y Calle **3:** SDS-UREA.



Los resultados obtenidos con los tratamientos estudiados reflejaron distintos patrones proteicos (Figura 5.4.). El tratamiento con SDS-UREA fue descartado, ya que no permitió la observación de bandas proteicas por encima de los 20 kDa, bandas que si aparecieron al tratar las muestras con el tampón de Laemmli (1970) y el NuPAGE®. A pesar de que con estos dos últimos tratamientos se pudieron observar bandas proteicas a lo largo de todo el rango de pesos moleculares, los perfiles obtenidos por ambos difirieron en algunos aspectos. En general, el tampón de Laemmli (1970) permitió una mayor definición de las bandas de proteínas comprendidas entre los 20 y los 29 kDa. Sin embargo, por encima de 29 kDa el NuPAGE® ofreció un perfil proteico mucho más completo, por lo que fue elegido para realizar el estudio de dicho perfil.

Por otro lado, se utilizaron geles de acrilamida al 15 % (Figura 5.4.B.) para mejorar la resolución de las bandas de bajo peso molecular. Dichos geles no permitieron una mayor resolución, por lo que se decidió hacer el estudio utilizando geles con una concentración de acrilamida del 12 %, que eran los que mostraban un perfil más completo.

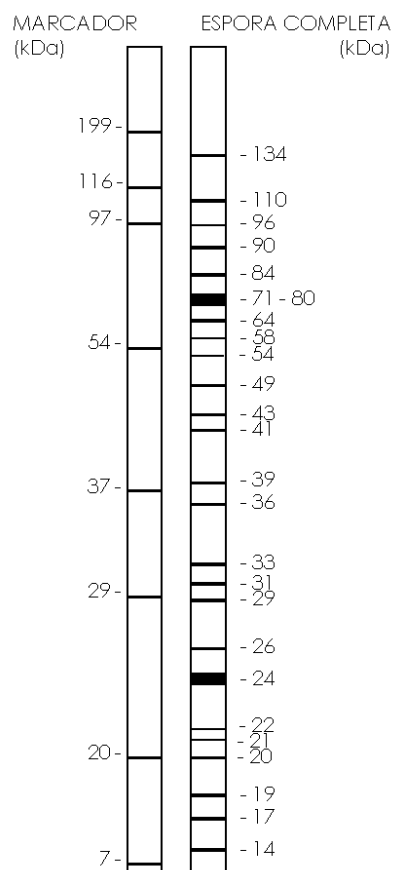


En la Tabla 4.3.12. y en la Figura 5.5. se presenta de manera esquemática el perfil proteico de espora completa de *N. ceranae*, obtenido por electroforesis (SDS-PAGE al 12 %) después del tratamiento con NuPAGE®.

**Tabla 4.3.12.** Pesos moleculares de las bandas presentes en el perfil proteico de espora completa de *N. ceranae* (SDS-PAGE al 12 %, tratamiento NuPAGE®).

134 kDa	Banda I
110 kDa	Banda II
96 kDa	Banda III
90 kDa	Banda IV
84 kDa	Banda V
71-80 kDa	Banda VI
64 kDa	Banda VII
58 kDa	Banda VIII
54 kDa	Banda IX
49 kDa	Banda X
43 kDa	Banda XI
41 kDa	Banda XII
39 kDa	Banda XIII
36 kDa	Banda XIV
33 kDa	Banda XV
31 kDa	Banda XVI
29 kDa	Banda XVII
26 kDa	Banda XVIII
24 kDa	Banda XIX
22 kDa	Banda XX
21 kDa	Banda XXI
20 kDa	Banda XXII
19 kDa	Banda XXIII
17 kDa	Banda XXIV
14 kDa	Banda XXV

**Figura 4.9.** Perfil proteico (kDa) de espora completa de *N. ceranae* (SDS-PAGE al 12%, tratamiento NuPAGE®).



El perfil proteico reveló un patrón electroforético (Tabla 4.3.12.) constituido por 25 bandas, cuyos pesos moleculares se determinaron por extrapolación en una curva de calibrado (log Pm Vs. Rf) elaborada con los marcadores de peso molecular (apartado 3.3.2.5.a.).

Dicho patrón presentó un amplio rango de pesos moleculares, comprendido entre los 14 y los 134 kDa (Tabla 4.3.12. y Figura 5.5.), en el que resalta una fracción proteica sin resolver entre las proteínas de alto peso molecular, que comprende el rango de 71 a 78 kDa.

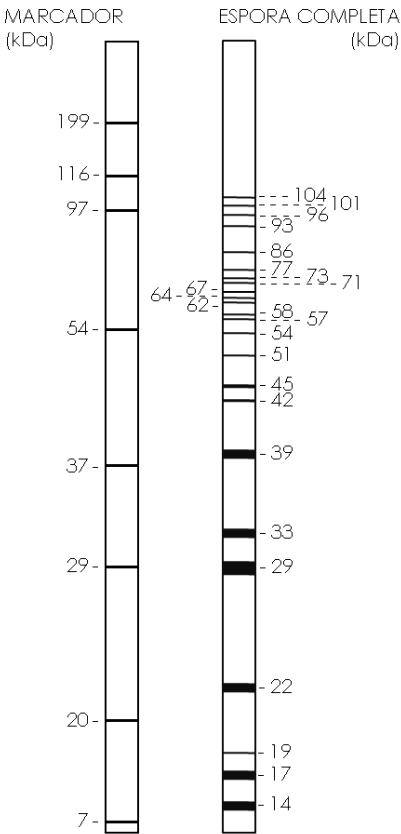
4.3.5.2. Perfil proteico de *N. apis*.

Una vez definidas las condiciones de la electroforesis, éstas se aplicaron para conocer el perfil electroforético de *N. apis*. Se utilizaron geles SDS-PAGE al 12 % de acrilamida, en los que se dispensaron 1x10<sup>7</sup> esporas totales por calle y tratadas mediante el tratamiento de NuPAGE® de Invitrogen.

**Tabla 4.3.13.** Pesos moleculares de las bandas presentes en el perfil proteico de espora espora completa de *N. apis* (SDS-PAGE al 12 %, tratamiento NuPAGE®).

104 kDa	Banda I
101 kDa	Banda II
96 kDa	Banda III
93 kDa	Banda IV
86 kDa	Banda V
77 kDa	Banda VI
73 kDa	Banda VII
71 kDa	Banda VIII
67 kDa	Banda IX
64 kDa	Banda X
62 kDa	Banda XI
58 kDa	Banda XII
57 kDa	Banda XIII
54 kDa	Banda XIV
51 kDa	Banda XV
45 kDa	Banda XVI
43 kDa	Banda XVII
39 kDa	Banda XVIII
33 kDa	Banda XIX
29 kDa	Banda XX
22 kDa	Banda XXI
19 kDa	Banda XXII
17 kDa	Banda XXIII
14 kDa	Banda XXIV

**Figura 4.10.** Perfil proteico (kDa) de espora completa de *N. apis* (SDS – PAGE al 12 %, tratamiento NuPAGE®).

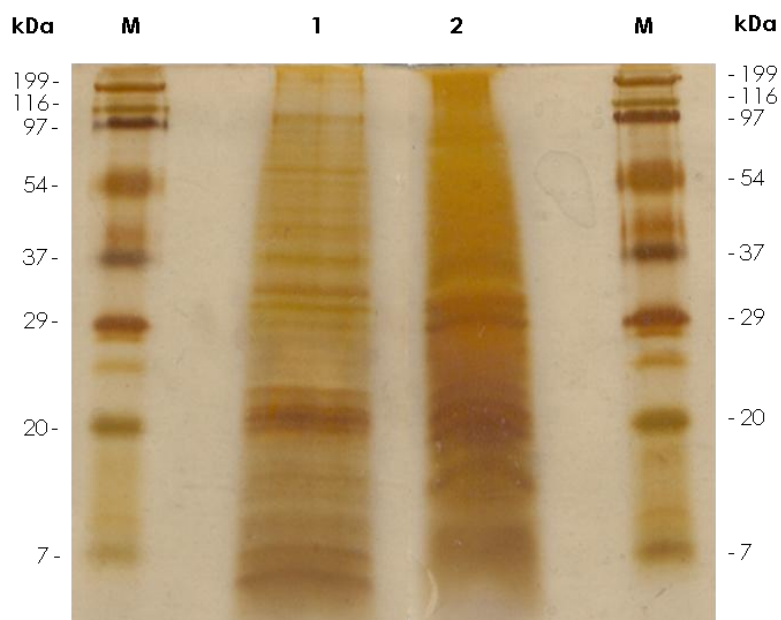


La tabla 4.3.13. y la Figura 5.6. muestran el perfil proteico de espora completa de *N. apis* que se obtuvo, y que en este caso constaba de 24 bandas comprendidas en un rango de pesos moleculares entre los 14 y 104 kDa, al calcularlo según el método citado anteriormente (apartado 3.3.2.5.a.).

4.3.5.3. Estudio comparativo de los perfiles proteicos de *N. ceranae* y *N. apis*.

Para poder comparar los perfiles proteicos de *N. ceranae* y *N. apis* obtenidos mediante SDS-PAGE al 12 % y su posterior tinción de plata (Figura 5.7.), en la Tabla 4.3.14. se muestran ambos perfiles, destacando las bandas proteicas que comparten.

**Figura 4.11.** Perfiles proteicos (kDa) mediante tinción de plata (SDS-PAGE al 12%, tratamiento NuPAGE®) **M:** Marcador de peso molecular (rango 199 - 7 kDa). Espora completa de: Calle **1:** *N. apis*; Calle **2:** *N. ceranae*.



Los resultados obtenidos muestran como ambas especies comparten bandas proteicas reveladas mediante la tinción de plata (Tabla 4.3.14.). Destaca un mayor número de bandas compartidas en el rango de pesos moleculares más bajos (en el último tercio del perfil, de 36 a 14 kDa), bandas de 33, 29, 22, 19, 17, y 14 kDa. Ambos perfiles también comparten cinco bandas proteicas de pesos moleculares intermedios (segundo tercio del perfil, de 71 a 39 kDa), que son las de 64, 58, 54, 43 y 39 kDa. Sin embargo, en el rango de alto peso molecular (primer tercio del perfil proteico, de 134 a 73 kDa) sólo hay una banda que sea coincidente, la de 96 kDa.

Hay que mencionar que entre el primer y el segundo tercio del perfil proteico de *N. ceranae* hay una fracción proteica sin resolver de los 80-71 kDa, que incluiría tres de las bandas observadas en el perfil de *N. apis*: 77, 73 y 71 kDa.

**Tabla 4.3.14.** Perfiles proteicos (kDa) de espora completa de *N. ceranae* y *N. apis* (SDS-PAGE al 12 %, tratamiento NuPAGE®).

TINCIÓN de PLATA			
	MARCADOR (kDa)	<i>N. ceranae</i> (kDa)	<i>N. apis</i> (kDa)
1 <sup>er</sup> tercio	199		
		134	
	116		
		110	
			104
			101
	97	96	96
			93
		90	
			86
		84	
		71-80	77
2 <sup>o</sup> tercio			73
			71
			67
		64	64
			62
		58	58
			57
	54	54	54
			51
		49	
			45
		43	43
3 <sup>er</sup> tercio		41	
		39	39
	37		
		36	
		33	33
		31	
	29	29	29
		26	
		24	
		22	22
		21	
	20	20	
		19	19
		17	17
		14	14
	7		

Bandas coincidentes

Posibles bandas coincidentes

#### **4.3.6. DETERMINACIÓN DE PERFILES DE INMUNORRECONOCIMIENTO DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A *N. ceranae* Y *N. apis* MEDIANTE INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (Western Blot).**

##### **4.3.6.1. Perfiles de inmunorreconocimiento del anticuerpo monoclonal F1. 6F10.**

El análisis mediante inmunoelectrotransferencia de espora completa de *N. ceranae* con el sobrenadante saturado del anticuerpo monoclonal F1. 6F10, reveló un perfil de bandas comprendido dentro de un rango de 150 a 17 kDa (Figura 5.8.A.). Destacan bandas de más intensidad, como las de 84 y 80 kDa, un doblete de 49 y 45 kDa, un triplete de 41, 39 y 36 kDa, y una banda de 22 kDa. Algunos intervalos no se pudieron resolver, como los comprendidos entre los 120 y los 110 kDa, entre 100 y 96 kDa o de 31 a 29 y 26 a 24 kDa.

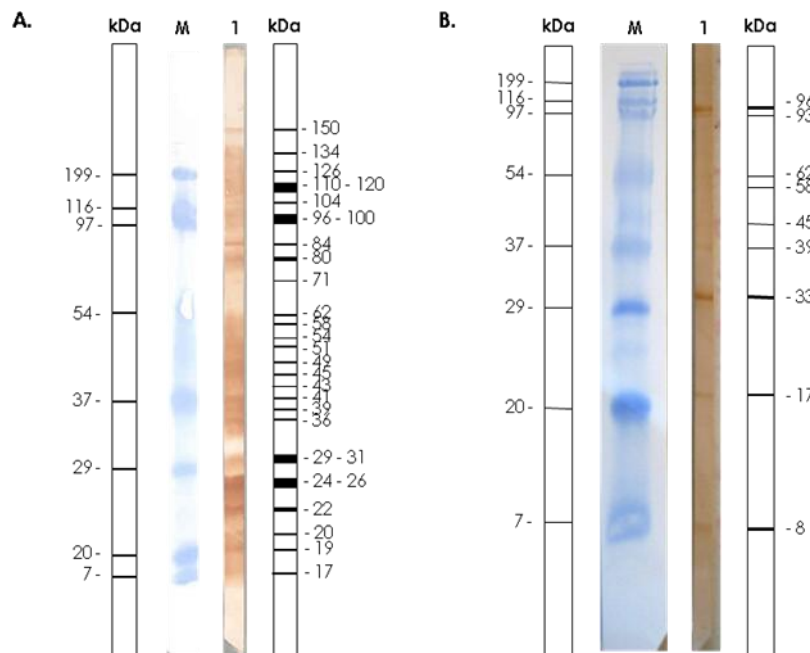
Con respecto al patrón de inmunorreconocimiento frente a *N. apis*, éste anticuerpo monoclonal presentó un patrón más reducido (Figura 5.8.B.). El mismo híbrido, enfrentado a la espora completa de *N. apis*, mostró un patrón de bandas más sencillo, que abarcaba los pesos moleculares de 96 a 8 kDa. Algunas de las bandas comprendidas en este perfil coincidieron con aquellas observadas en el de *N. ceranae*. Así, la primera banda de 96 kDa solaparía con la fracción sin resolver del perfil anterior que se encontraba a esa altura (100-96 kDa). De igual manera, el resto de las bandas se encontraron en ambos perfiles con excepción de las de 93, 33 y 8 kDa, que éste monoclonal presentaría exclusivamente en el perfil frente a *N. apis*.

##### **4.3.6.2. Perfiles de inmunorreconocimiento del anticuerpo monoclonal F1. 7D2.**

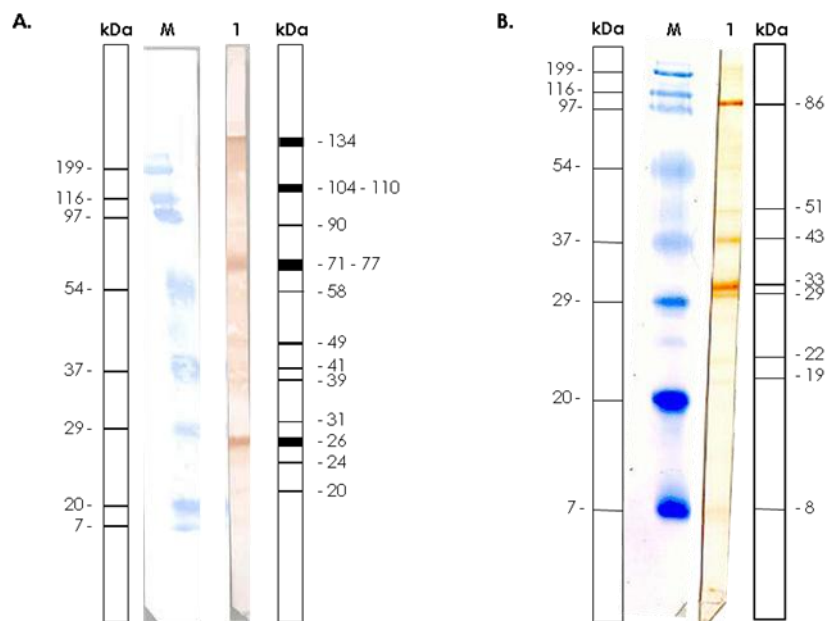
El patrón de inmunorreconocimiento del sobrenadante saturado del anticuerpo monoclonal F1. 7D2 frente a espora completa de *N. ceranae*, abarcó un rango de 134 a 20 kDa (Figura 5.9.A.). En este perfil se encontraron dos fracciones proteicas sin resolver, la primera comprendida entre los 110 y 104 kDa y la segunda de 77 a 71 kDa. Cabe destacar la presencia de un doblete, formado por las bandas de 41 y 39 kDa, así como una banda de gran intensidad de aproximadamente 26 kDa.

Así mismo, el patrón obtenido frente a *N. apis* presentó un rango de inmunorreconocimiento que abarcó de los 86 a los 8 kDa (Figura 5.9.B.), destacando la presencia de un doblete de 33 y 29 kDa y dos bandas de mayor intensidad de 86 y 43 kDa. Ninguna de las bandas coincidió con las observadas en el perfil frente a *N. ceranae*.

**Figura 4.12.** Patrón de inmunorreconocimiento antigénico revelado mediante *Western-Blot* (SDS-PAGE al 12%) del sobrenadante saturado del anticuerpo monoclonal F1. 6F10 frente al extracto de espora completa de *N. ceranae* (A) y *N. apis* (B). **M:** Marcador de peso molecular (rango 199 - 7 kDa); **Calle 1:** extracto de espora completa.



**Figura 4.13.** Patrón de inmunorreconocimiento antigénico revelado mediante *Western-Blot* (SDS-PAGE al 12%) del sobrenadante saturado del anticuerpo monoclonal F1. 7D2 frente al extracto de espora completa de *N. ceranae* (A) y *N. apis* (B). **M:** Marcador de peso molecular (rango 199 - 7 kDa); **Calle 1:** extracto de espora completa.



#### 4.3.6.3. Perfiles de inmunorreconocimiento del anticuerpo monoclonal F4. 1B11.

El sobrenadante saturado del anticuerpo monoclonal F4. 1B11 reveló un patrón de bandas proteicas entre los 145 y los 17 kDa (Figura 5.10.A.). Se observaron algunas bandas más intensas de 110, 104, 93, 71, 29 y 26 kDa, así como algunas fracciones proteicas sin resolver de 137 a 126 kDa, de 90 a 80 kDa, de 64 a 58 kDa y de 39 a 36 kDa.

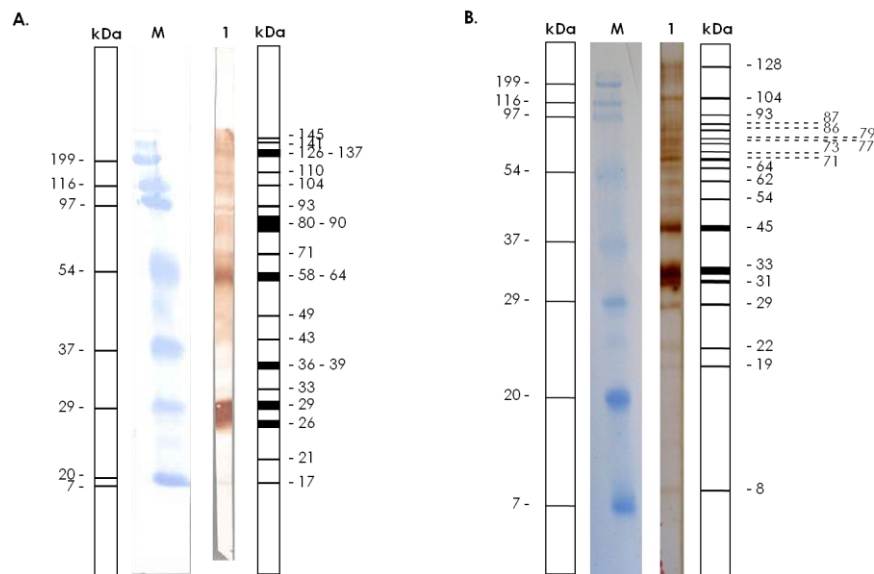
Por el contrario, si comparamos este perfil con el obtenido frente a espora completa de *N. apis* (Figura 5.10.B.) se puede observar que algunas de las bandas coincidieron con el patrón de *N. ceranae*, como por ejemplo las de 104 y 93 kDa. Además, se observó un doblete a 87 y 86 kDa, que solaparía con el rango de pesos moleculares de una de las fracciones sin resolver obtenidas frente a *N. ceranae* (80-90 kDa). Así mismo, del doblete de bandas con pesos de 73 y 71 kDa sólo se encontró correspondencia para ésta última (71 kDa) en el perfil frente a *N. ceranae*. La banda de 64 kDa que se observó frente a *N. apis* estaría comprendida en otra de las fracciones sin resolver del perfil de *N. ceranae* (64-58 kDa). Finalmente las bandas de 33 y 29 kDa de peso molecular se encontraron en ambos perfiles, aunque con distinta intensidad de reconocimiento. El resto de las bandas observadas en el perfil de espora completa de *N. apis* fueron exclusivas de este patrón, por estar ausentes en el de *N. ceranae*.

#### 4.3.6.4. Perfiles de inmunorreconocimiento del anticuerpo monoclonal F4. 9G2.

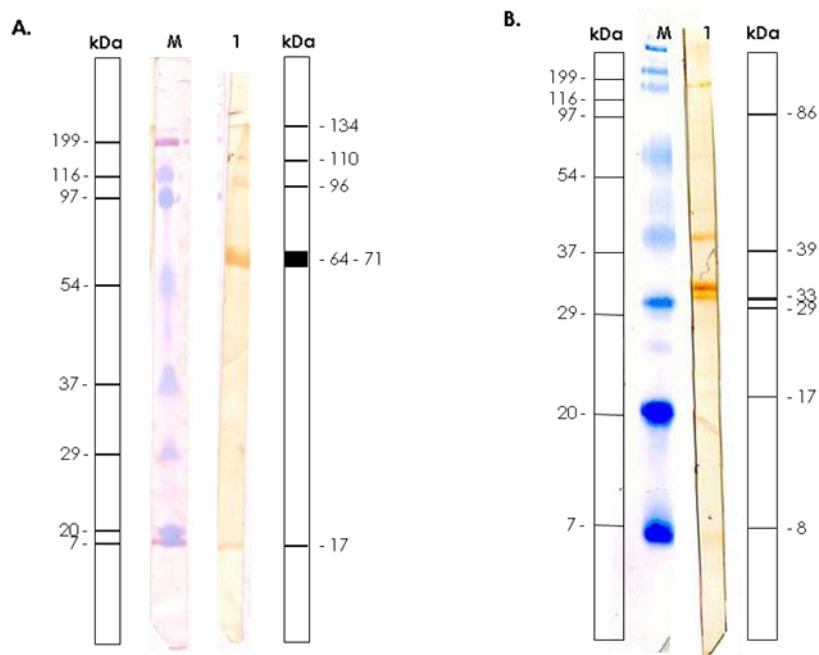
Por último, el sobrenadante saturado del anticuerpo monoclonal F4. 9G2 frente a espora completa de *N. ceranae* mostró un patrón de inmunorreconocimiento más reducido (Figura 5.11.A), abarcando desde los 134 a los 17 kDa y destacando una fracción proteica sin resolver de 71 a 64 kDa.

El estudio con espora completa de *N. apis* (Figura 5.11.B) mostró un perfil dentro del rango comprendido entre los 86 a 8 kDa, resaltando la presencia de un doblete de bandas de 33 y 29 kDa de peso molecular. Sólo la banda de 17 kDa coincidió en los perfiles de *N. apis* y *N. ceranae*.

**Figura 4.14.** Patrón de inmunorreconocimiento antigénico revelado mediante *Western-Blot* (SDS-PAGE al 12%) del sobrenadante saturado del anticuerpo monoclonal F4. 1B11 frente al extracto de espora completa de *N. ceranae* (A) y *N. apis* (B). **M:** Marcador de peso molecular (rango 199 - 7 kDa); **Calle 1:** extracto de espora completa.



**Figura 4.15.** Patrón de inmunorreconocimiento antigénico revelado mediante *Western-Blot* (SDS-PAGE al 12%) del sobrenadante saturado del anticuerpo monoclonal F4. 9G2 frente al extracto de espora completa de *N. ceranae* (A) y *N. apis* (B). **M:** Marcador de peso molecular (rango 199 - 7 kDa); **Calle 1:** extracto de espora completa.





#### 4.4. **EVALUACIÓN DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES EN EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE *N. ceranae* y *N. apis*.**

##### 4.4.1. **DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE *N. ceranae* y *N. apis* MEDIANTE IFI.**

Se llevó a cabo un estudio en 180 muestras de colmenas para detectar mediante IFI la presencia de *N. ceranae* y/o *N. apis*. Para realizar la IFI se utilizaron los anticuerpos monoclonales obtenidos y seleccionados en el apartado 3.2. y caracterizados en el apartado 3.3.: F1.6F10; F1.7D2, F4.1B11 y F4.9G2 (Tabla 4.3.1.).

En la Tabla 4.4.2. se muestran los resultados obtenidos en las 180 colmenas mediante la técnica de IFI, así como los obtenidos previamente en el CAR utilizando microscopía óptica con contraste de fases (MO) y PCR múltiple (Martín-Hernández y col., 2007).

##### 4.4.1.1. **Estudio con el anticuerpo monoclonal F1. 6F10 frente a *Nosema* spp.**

Los resultados obtenidos mediante la técnica de IFI con el anticuerpo monoclonal F1. 6F10 (Tabla 4.4.1.), que reconoce *N. ceranae* y *N. apis*, revelaron la presencia de alguna de estas dos especies en 136 de las 180 colmenas estudiadas. Esto supone el 75,5 % del total frente al 24,5 % restante, es decir, 44 colmenas negativas (Tabla 4.4.1.). Con respecto a la técnica de PCR múltiple, esta diagnosticó exactamente el mismo número de colmenas positivas y negativas para la presencia de alguna de las especies de *Nosema* en las colmenas estudiadas (Tabla 4.4.1.).

**Tabla 4.4.1.** Porcentaje de resultados positivos y negativos en la detección de *N. ceranae* y/o *N. apis* en 180 colmenas mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando el anticuerpo monoclonal F1. 6F10; mediante PCR y mediante microscopía óptica (MO).

	PCR	IFI (F1. 6F10)	MO
<b>Nº positivos (%)</b>	136 (75,5)	136 (75,5)	135 (75)
<b>Nº negativos (%)</b>	44 (24,5)	44 (24,5)	45 (25)

Si comparamos más detalladamente los resultados obtenidos con la IFI utilizando F1. 6F10 con los de la PCR múltiple, se puede observar que la IFI detectó esporas de *N. ceranae* y/o *N. apis* en tres colmenas (1,6 %) en las que la PCR no lo hizo. Dado que la técnica de la PCR se ha tomado como referencia para el estudio, estos resultados se considerarían como falsos positivos. De igual modo, la IFI reveló tres falsos negativos (1,6 %), en los que no detectó esporas de ninguna de las dos especies que si detectó la PCR (Tablas 4.4.2. y 4.4.5.).

**Tabla 4.4.2.** Detección de *N. apis* y/o *N. ceranae* en 180 colmenas mediante PCR, inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando el anticuerpo policlonal de conejo (Pc) y los sobrenadantes saturados de los híbridos F1. 6F10; F1. 7D2; F4. 1B11 y F4. 9G2 y microscopía óptica (MO).

NºREGISTRO	PCR	IFI(6F10)	IFI(Pc)	IFI(7D2)	IFI(1B11)	IFI(9G2)	MO
PA 169 /06	a+c	Nos +	cer +	cer -	cer +	apis +	apis
PA 347 /06	a+c	Nos +	cer -	cer -	cer +	apis +	apis
PA 689 /06	a+c	Nos +	cer +	cer +	cer -	apis -	apis
PA 1413 /06	a+c	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	apis
PA 1466 /06	a+c	Nos +	cer +	cer -	cer -	apis +	apis
PA 1473 /06	a+c	Nos +	cer +	cer -	cer -	apis -	apis
PA 1568 /06	a+c	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis +	apis
PA 1604 /06	a+c	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis +	apis
PA 406 /06	a+c	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis +	cer
PA 1003 /06	a+c	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	cer
PA 524 /06	a+c	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis +	a+c
PA 538 /06	a+c	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis +	a+c
PA 583 /06	a+c	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis +	a+c
PA 645 /06	a+c	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis +	a+c
PA 692 /06	a+c	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	a+c
PA 787 /06	a+c	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	a+c
PA 839 /06	a+c	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	a+c
PA 895 /06	a+c	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis +	a+c
PA 1002 /06	a+c	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis +	a+c
PA 1030 /06	a+c	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis +	a+c
PA 1063 /06	a+c	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis +	a+c
PA 1159 /06	a+c	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis +	a+c
PA 1171 /06	a+c	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis +	a+c
PA 1225 /06	a+c	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	a+c
PA 1314 /06	a+c	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	a+c
PA 1345 /06	a+c	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis +	a+c
PA 1431 /06	a+c	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	a+c
PA 1433 /06	a+c	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	a+c
PA 1471 /06	a+c	Nos +	cer -	cer +	cer -	apis -	a+c
PA 1484 /06	a+c	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis +	a+c
PA 191 /07	a+c	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	a+c
PA 695 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis +	apis
PA 209 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	cer
PA 215 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	cer
PA 216 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	cer
PA 218 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	cer
PA 296 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	cer
PA 300 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	cer
PA 301 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	cer
PA 320 /06	cer	Nos +	cer +	cer -	cer +	apis -	cer
PA 358 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	cer
PA 367 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	cer
PA 393 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	cer
PA 417 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis +	cer
PA 444 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	cer

Nos = Presencia de *N. apis* y/o *N. ceranae*; a+c = Presencia de *N. apis* y *N. ceranae*; cer = Presencia de *N. ceranae*; apis = Presencia de *N. apis*.

Falso negativo. 
  Falso positivo. 
  Falso negativo para *N. apis*.  
 Falso negativo para *N. ceranae*. 
  Falso negativo para *N. ceranae*/ Falso positivo para *N. apis*.

**Tabla 4.4.2.** (Continuación) Detección de *N. apis* y/o *N. ceranae* en 180 colmenas mediante PCR, inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando el anticuerpo policlonal de conejo (Pc) y los sobrenadantes saturados de los híbridos F1. 6F10; F1. 7D2; F4. 1B11 y F4. 9G2 y microscopía óptica (MO).

	NºREGISTRO	PCR	IFI(6F10)	IFI(Pc)	IFI(7D2)	IFI(1B11)	IFI(9G2)	MO
PCR = cer ; n = 63	PA 445 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	cer
	PA 452 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	cer
	PA 465 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	cer
	PA 466 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	cer
	PA 999 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	cer
	PA 1000 /06	cer	Nos +	cer -	cer +	cer +	apis -	cer
	PA 1001 /06	cer	Nos +	cer -	cer +	cer -	apis -	cer
	PA 1010 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	cer
	PA 1011 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	cer
	PA 1015 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	cer
	PA 1019 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	cer
	PA 1025 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	cer
	PA 1026 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis +	cer
	PA 1027 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	cer
	PA 1029 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	cer
	PA 1032 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis +	cer
	PA 1033 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	cer
	PA 1034 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	cer
	PA 1036 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	cer
	PA 1038 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis +	cer
	PA 1040 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	cer
	PA 1041 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	cer
	PA 1046 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	cer
	PA 1048 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	cer
	PA 1049 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis +	cer
	PA 1051 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	cer
	PA 1053 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis +	cer
	PA 1054 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	cer
	PA 1055 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	cer
	PA 357 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis +	a+c
	PA 434 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis +	a+c
	PA 447 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis +	a+c
	PA 532 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	a+c
	PA 533 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis +	a+c
	PA 543 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	a+c
	PA 544 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	a+c
	PA 764 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	a+c
	PA 1091 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	a+c
	PA 1100 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	a+c
	PA 1175 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	a+c
	PA 1179 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	a+c
	PA 1255 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	a+c
	PA 1268 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	a+c
	PA 1490 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	a+c
	PA 116 /07	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis +	a+c

Nos = Presencia de *N. apis* y/o *N. ceranae*; a+c = Presencia de *N. apis* y *N. ceranae*; cer = Presencia de *N. ceranae*; apis = Presencia de *N. apis*.

Falso negativo.  Falso positivo.  Falso positivo para *N. apis*.

**Tabla 4.4.2.** (Continuación) Detección de *N. apis* y/o *N. ceranae* en 180 colmenas mediante PCR, mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando el anticuerpo policlonal de conejo (Pc) y los sobrenadantes saturados de los híbridos F1. 6F10; F1. 7D2; F4. 1B11 y F4. 9G2 y microscopía óptica (MO).

NºREGISTRO	PCR	IFI(6F10)	IFI(Pc)	IFI(7D2)	IFI(1B11)	IFI(9G2)	MO
PA 144 /07	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis +	a+c
PA 145 /07	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	a+c
PA 198 /06	cer	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	-
PA 351 /06	cer	Nos -	cer -	cer -	cer -	apis -	-
PA 166 /06	apis	Nos +	cer -	cer -	cer -	apis +	apis
PA 170 /06	apis	Nos +	cer -	cer -	cer -	apis +	apis
PA 176 /06	apis	Nos +	cer -	cer -	cer -	apis +	apis
PA 394 /06	apis	Nos +	cer -	cer -	cer -	apis +	apis
PA 418 /06	apis	Nos +	cer -	cer +	cer -	apis -	apis
PA 464 /06	apis	Nos -	cer -	cer -	cer -	apis -	apis
PA 535 /06	apis	Nos +	cer -	cer -	cer -	apis +	apis
PA 694 /06	apis	Nos +	cer -	cer -	cer -	apis +	apis
PA 703 /06	apis	Nos +	cer -	cer -	cer +	apis +	apis
PA 780 /06	apis	Nos +	cer -	cer -	cer -	apis +	apis
PA 823 /06	apis	Nos +	cer -	cer -	cer -	apis +	apis
PA 837 /06	apis	Nos +	cer -	cer +	cer -	apis -	apis
PA 838 /06	apis	Nos +	cer -	cer +	cer -	apis +	apis
PA 841 /06	apis	Nos +	cer -	cer -	cer -	apis -	apis
PA 853 /06	apis	Nos +	cer -	cer -	cer -	apis +	apis
PA 864 /06	apis	Nos +	cer -	cer -	cer -	apis +	apis
PA 874 /06	apis	Nos +	cer -	cer -	cer -	apis +	apis
PA 923 /06	apis	Nos +	cer -	cer -	cer -	apis -	apis
PA 926 /06	apis	Nos +	cer -	cer -	cer -	apis +	apis
PA 1117 /06	apis	Nos +	cer -	cer +	cer -	apis +	apis
PA 1119 /06	apis	Nos +	cer -	cer -	cer -	apis +	apis
PA 1177 /06	apis	Nos +	cer -	cer -	cer -	apis -	apis
PA 1182 /06	apis	Nos +	cer -	cer -	cer -	apis +	apis
PA 1313 /06	apis	Nos +	cer +	cer +	cer -	apis +	apis
PA 1320 /06	apis	Nos +	cer -	cer -	cer -	apis +	apis
PA 1423 /06	apis	Nos +	cer -	cer +	cer -	apis -	apis
PA 1442 /06	apis	Nos +	cer -	cer -	cer -	apis +	apis
PA 1463 /06	apis	Nos +	cer -	cer -	cer -	apis +	apis
PA 1598 /06	apis	Nos +	cer -	cer +	cer -	apis -	apis
PA 1605 /06	apis	Nos +	cer -	cer -	cer -	apis +	apis
PA 1642 /06	apis	Nos +	cer -	cer +	cer +	apis -	apis
PA 1654 /06	apis	Nos +	cer +	cer -	cer -	apis +	apis
PA 1747 /06	apis	Nos +	cer -	cer -	cer +	apis +	apis
PA 1769 /06	apis	Nos +	cer -	cer -	cer -	apis -	apis
PA 1770 /06	apis	Nos +	cer -	cer -	cer -	apis -	apis
PA 348 /06	apis	Nos +	cer -	cer -	cer -	apis -	cer
PA 364 /06	apis	Nos +	cer -	cer -	cer -	apis +	a+c
PA 398 /06	apis	Nos +	cer -	cer -	cer -	apis +	a+c
PA 556 /06	apis	Nos +	cer +	cer +	cer +	apis -	a+c
PA 693 /06	apis	Nos +	cer -	cer -	cer -	apis +	a+c
PA 755 /06	apis	Nos +	cer -	cer -	cer -	apis +	a+c

PCR = apis; n = 42

Nos = Presencia de *N. apis* y/o *N. ceranae*; a+c = Presencia de *N. apis* y *N. ceranae*; cer = Presencia de *N. ceranae*; apis = Presencia de *N. apis*.

Falso negativo.
  Falso positivo.
  Falso positivo para *N. apis*.
  Falso positivo para *N. ceranae*.
  Falso negativo para *N. apis*/ Falso positivo para *N. ceranae*.

**Tabla 4.4.2.** (Continuación) Detección de *N. apis* y/o *N. ceranae* en 180 colmenas mediante PCR, inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando el anticuerpo policlonal de conejo (Pc) y los sobrenadantes saturados de los híbridos F1. 6F10; F1. 7D2; F4. 1B11 y F4. 9G2 y microscopía óptica (MO).

	NºREGISTRO	PCR	IFI(6F10)	IFI(Pc)	IFI(7D2)	IFI(1B11)	IFI(9G2)	MO
PCR = Negativa; n = 44	PA 167 /06	apis	Nos -	cer -	cer -	cer -	apis -	-
	PA 1178 /06	-	Nos -	cer -	cer +	cer -	apis -	apis
	PA 1176 /06	-	Nos -	cer -	cer -	cer +	apis -	a+c
	PA 165 /06	-	Nos -	cer -	cer -	cer -	apis -	-
	PA 171 /06	-	Nos -	cer -	cer -	cer -	apis -	-
	PA 172 /06	-	Nos -	cer -	cer -	cer -	apis -	-
	PA 173 /06	-	Nos -	cer -	cer -	cer -	apis -	-
	PA 174 /06	-	Nos -	cer -	cer -	cer -	apis -	-
	PA 177 /06	-	Nos -	cer -	cer -	cer -	apis -	-
	PA 178 /06	-	Nos -	cer -	cer -	cer -	apis -	-
	PA 189 /06	-	Nos -	cer -	cer -	cer -	apis -	-
	PA 190 /06	-	Nos -	cer -	cer -	cer -	apis -	-
	PA 191 /06	-	Nos +	cer -	cer -	cer -	apis -	-
	PA 192 /06	-	Nos -	cer -	cer -	cer -	apis -	-
	PA 193 /06	-	Nos -	cer -	cer -	cer -	apis -	-
	PA 194 /06	-	Nos -	cer -	cer -	cer -	apis -	-
	PA 195 /06	-	Nos -	cer -	cer -	cer -	apis -	-
	PA 196 /06	-	Nos -	cer -	cer -	cer -	apis -	-
	PA 197 /06	-	Nos -	cer -	cer -	cer -	apis -	-
	PA 199 /06	-	Nos -	cer -	cer -	cer -	apis -	-
	PA 200 /06	-	Nos -	cer -	cer -	cer -	apis -	-
	PA 202 /06	-	Nos -	cer -	cer -	cer -	apis -	-
	PA 203 /06	-	Nos -	cer -	cer -	cer -	apis -	-
	PA 204 /06	-	Nos -	cer -	cer -	cer -	apis -	-
	PA 205 /06	-	Nos -	cer -	cer -	cer -	apis -	-
	PA 208 /06	-	Nos -	cer -	cer -	cer -	apis -	-
	PA 210 /06	-	Nos -	cer -	cer -	cer -	apis -	-
	PA 211 /06	-	Nos -	cer -	cer -	cer -	apis -	-
	PA 213 /06	-	Nos +	cer -	cer -	cer -	apis -	-
	PA 214 /06	-	Nos +	cer -	cer -	cer -	apis -	-
	PA 217 /06	-	Nos -	cer -	cer -	cer -	apis -	-
	PA 293 /06	-	Nos -	cer -	cer -	cer -	apis -	-
	PA 294 /06	-	Nos -	cer -	cer -	cer -	apis -	-
	PA 298 /06	-	Nos -	cer -	cer -	cer -	apis -	-
	PA 299 /06	-	Nos -	cer +	cer -	cer +	apis -	-
	PA 303 /06	-	Nos -	cer -	cer -	cer -	apis -	-
	PA 304 /06	-	Nos -	cer -	cer -	cer -	apis -	-
	PA 307 /06	-	Nos -	cer -	cer -	cer -	apis -	-
	PA 346 /06	-	Nos -	cer -	cer -	cer +	apis -	-
	PA 350 /06	-	Nos -	cer -	cer -	cer -	apis -	-
	PA 352 /06	-	Nos -	cer -	cer -	cer -	apis -	-
	PA 353 /06	-	Nos -	cer -	cer -	cer -	apis -	-
	PA 354 /06	-	Nos -	cer -	cer -	cer -	apis -	-
	PA 355 /06	-	Nos -	cer -	cer -	cer -	apis -	-
	PA 1008 /06	-	Nos -	cer -	cer -	cer -	apis -	-

Nos = Presencia de *N. apis* y/o *N. ceranae*; a+c = Presencia de *N. apis* y *N. ceranae*; cer = Presencia de *N. ceranae*; apis = Presencia de *N. apis*.

■ Falso negativo. ■ Falso positivo.

La microscopía óptica reveló unos resultados muy parecidos a los de la IFI al identificar la presencia de esporas de *Nosema* spp. en 135 (75 %) las colmenas estudiadas (Tabla 4.4.1.), mostrando 3 falsos negativos (1,6 %) y 2 falsos positivos (1,1 %). Sin embargo, a la hora de identificar la especie concreta a la que pertenecían dichas esporas, la MO presentó un mayor número de falsos diagnósticos, los cuales se comentarán más detalladamente en los siguientes epígrafes.

#### 4.4.1.2. Estudios con los anticuerpos monoclonales frente a *N. ceranae*.

##### a) Estudio con el anticuerpo monoclonal F1. 7D2.

Los resultados correspondientes al anticuerpo monoclonal F1. 7D2, que reconoce específicamente a *N. ceranae*, mostraron la presencia de esporas de ésta especie en 98 de las 180 colmenas, mientras que en las 82 restantes éstas no se detectaron (Tabla 4.4.2.). Esto se refleja en la tabla correspondiente con un 54,4 % de positivas y un 45,6 % de negativas (Tabla 4.4.3.). Los resultados obtenidos con la PCR para el diagnóstico de esta especie revelaron un 52,2 % de colmenas infectadas por *N. ceranae* (Tabla 4.4.3.).

**Tabla 4.4.3.** Porcentaje de resultados positivos y negativos en la detección de *N. ceranae* en 180 colmenas mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando el anticuerpo policlonal (Pc) y los anticuerpos monoclonales F1. 7D2 y F4. 1B11; mediante PCR y mediante microscopía óptica (MO).

	PCR	IFI (Pc)	IFI (F1. 7D2)	IFI (F4. 1B11)	MO
<b>Nº positivos (%)</b>	94 (52,2)	93 (51,6)	98 (54,4)	95 (52,7)	90 (50)
<b>Nº negativos (%)</b>	86 (47,8)	87 (48,3)	82 (45,6)	85 (47,3)	90 (50)

En la Tabla 4.4.2. se puede observar que la diferencia de porcentajes entre las dos técnicas se debe a los 6 falsos negativos (3,3 %) y los 10 falsos positivos (5,5 %) que mostró la IFI con F1. 7D2, al comparar sus resultados con los de la PCR (Tabla 4.4.5.).

En este caso, la microscopía óptica presentó unos resultados similares a los de la IFI detectando 90 colmenas positivas (50 %) para la presencia de *N. ceranae* y 90 negativas (50 %) (Tabla 4.4.3.), porcentajes dados por la detección de 11 falsos negativos (6,1%) y 7 falsos positivos (3,8 %). Sin embargo, respecto al diagnóstico de ambas especies (dado que la microscopía óptica identifica a ambas), el número de falsos diagnósticos aumenta (Tabla 4.4.5.) debido a los casos en los que esta técnica confunde ambas especies (Tabla 4.4.2.).

#### b) Estudio con el anticuerpo monoclonal F4. 1B11.

Con respecto a los resultados obtenidos con el anticuerpo monoclonal F4. 1B11 (Tabla 4.4.2.), que también reconoce específicamente la especie *N. ceranae*, éstos reflejan 95 (52,7 %) colmenas positivas y 85 (47,3 %) negativas (Tabla 4.4.3.), en contraste con las 94 (52,2 %) colmenas positivas y las 86 (47,8 %) negativas identificadas con la PCR (Tabla 4.4.3.).

La técnica de IFI utilizando este anticuerpo monoclonal presentó 6 falsos negativos (3,3 %) y 7 falsos positivos (3,8 %), cuando comparamos sus resultados con los de la técnica de biología molecular de la PCR múltiple (Tabla 4.4.2. y 4.4.5.).

En el apartado anterior ya se han descrito los resultados obtenidos por la microscopía óptica con respecto al diagnóstico de *N. ceranae* y los problemas que surgen al tener en cuenta su diferenciación de *N. apis*.

#### 4.4.1.3. Estudio con el anticuerpo monoclonal F4. 9G2 frente a *N. apis*.

Finalmente se estudió el anticuerpo monoclonal F4. 9G2, el único que presenta reactividad específica frente a *N. apis*, y al utilizarlo con la técnica de IFI éste detectó la presencia de esta especie, solo o en coinfección con *N. ceranae* (Tabla 4.4.2.), en 60 colmenas (33,3 % de positivas), y su ausencia en 120 (66,7 % de negativas). En el caso de la PCR múltiple, los resultados revelaron 73 colmenas positivas y 107 negativas, lo que supone unos porcentajes de 40,6 % y 59,4 % respectivamente (Tabla 4.4.4.).

Este anticuerpo, al utilizarlo en la IFI, mostró unos resultados con 26 falsos negativos (14,4 %) y 13 (7,2 %) falsos positivos cuando se compararon con los revelados por la PCR múltiple (Tabla 4.4.2. y 4.4.5.).

Respecto a la MO, esta presentó unos resultados para la identificación de *N. apis* que fueron diferentes a los de la técnica de PCR en cuatro colmenas, revelando la presencia de esta especie en el 50 % de las mismas (90 colmenas). Al analizar los falsos diagnósticos producidos por la MO se encontraron 4 falsos negativos (2,2 %) y 21 falsos positivos (11,6 %).

**Tabla 4.4.4.** Porcentaje de resultados positivos y negativos en la detección de *N. apis* en 180 colmenas mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando el anticuerpo monoclonal F4. 9G2; mediante PCR y mediante microscopía óptica (MO).

	PCR	IFI (F4. 9G2)	MO
<b>Nº positivos (%)</b>	73 (40,6)	60 (33,3)	90 (50)
<b>Nº negativos (%)</b>	107 (59,4)	120 (66,7)	90 (50)

A continuación, en la Tabla 4.4.5. se muestra un resumen de los falsos diagnósticos respecto a la PCR (técnica de referencia) obtenidos con las distintas técnicas estudiadas:

**Tabla 4.4.5.** Resumen de los falsos positivos y negativos obtenidos por la inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando los distintos anticuerpos policlonal y monoclonales así como por la microscopía óptica (MO).

ANTICUERPO	RESULTADO	TÉCNICA DIAGNÓSTICA		
		IFI	MO	MO (TOTAL)
<b>F1. 6F10</b>	FN (%)	3 (1,6)	3 (1,6 %)¹	
	FP (%)	3 (1,6)	2 (1,1 %)¹	
<b>Policlonal</b>	FN (%)	5 (2,7)		
	FP (%)	4 (2,2)		
<b>F1. 7D2</b>	FN (%)	6 (3,3)	11 (6,1%)²	15 (8,3)⁴
	FP (%)	10 (5,5)	7 (3,8 %)²	25 (13,8)⁴
<b>F4. 1B11</b>	FN (%)	6 (3,3)		
	FP (%)	7 (3,8)		
<b>F4. 9G2</b>	FN (%)	26 (14,4)	4 (2,2 %)³	
	FP (%)	13 (7,2)	21 (11,6 %)³	

FN = Falsos negativos; FP = Falsos positivos; 1 = Respecto a la presencia de *Nosema* sp.; 2 = Respecto a la presencia de *N. ceranae*; 3 = Respecto a la presencia de *N. apis*; 4 = Respecto a la presencia de *N. ceranae* y/o *N. apis*.

#### 4.4.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.

Se realizó un estudio comparativo de la técnica de IFI desarrollada en el presente trabajo, utilizando los sobrenadantes saturados de los anticuerpos monoclonales F1. 6F10, F1. 7D2, F4. 1B11 y F4. 9G2 (apartado 4.4.1.), con la IFI utilizando el suero policlonal de conejo frente a *N. ceranae* (apartado 4.1.1.4.), así como con las técnicas de microscopía óptica (MO) y PCR múltiple (Martin-Hernandez y col., 2007).

La significación de las diferencias mostradas en la comparación de dichas técnicas se estudió mediante un análisis estadístico de los resultados, realizando una prueba de Test Diagnóstico en la que se tomó como patrón de oro la técnica de PCR utilizada en el CAR, centro de referencia para el diagnóstico de estos parásitos en España. Paralelamente se realizaron un análisis de concordancia (Kappa de Cohen) y una comparación de proporciones mediante *Chi* cuadrado.

##### 4.4.2.1. Anticuerpo monoclonal F1. 6F10 frente a *Nosema* spp.

Dado que el anticuerpo monoclonal F1. 6F10 reconoce tanto *N. apis* como *N. ceranae*, para la realización de éste análisis estadístico se tuvieron en cuenta como resultado positivo



aquellas colmenas en las que se detectó la presencia de alguna de las dos especies, o bien de ambas en coinfección. La tabla de contingencia obtenida al realizar el análisis se muestra a continuación (Tabla 4.4.6.):

**Tabla 4.4.6.** Tabla de contingencia: PCR frente a IFI con F1. 6F10.

		IFI (F1. 6F10)		TOTAL
		-	+	
PCR	-	41	3	44
	+	3	133	136
TOTAL		44	136	180

+ = Presencia de *N. apis* y/o *N. ceranae*.

Se observó que ambas técnicas coincidieron en el diagnóstico de 174 de las 180 colmenas: 41 negativas y 133 positivas. Esta coincidencia de los resultados se traduce en una alta significancia del valor de *Chi* cuadrado ( $Chi = 148,979$  con  $p \leq 0,05$ ), apoyado por un Índice de Concordancia muy bueno ( $\kappa = 0,91$ ) en la escala de Altman (Tabla 4.1.10.). En la tabla de contingencia (Tabla 4.4.6.) se muestran además el número de colmenas en las que los resultados de ambas técnicas han diferido, es decir, los falsos diagnósticos que se han descrito en el apartado 4.4.1.

Cuando se realizó el mismo análisis comparando la PCR múltiple (prueba de referencia) con la MO, se obtuvieron unos resultados muy parecidos, como se puede apreciar en la siguiente tabla (Tabla 4.4.7.):

**Tabla 4.4.7.** Tabla de contingencia: PCR frente a MO.

		MO		TOTAL
		-	+	
PCR	-	42	2	44
	+	3	133	136
TOTAL		45	135	180

+ = Presencia de *N. ceranae* y/o *N. apis*.

El hecho de que MO y PCR coincidieran en el diagnóstico de una colmena más, es decir 175 colmenas (42 negativas y 133 positivas), hizo que tanto el valor de *Chi* cuadrado ( $Chi = 154,171$  con  $p \leq 0,05$ ) como el Índice de Concordancia ( $\kappa = 0,925$ , muy buena, Tabla 4.1.10.) aumentaran con respecto a los de la IFI. Aún así, la significancia de las técnicas de MO e IFI con el anticuerpo monoclonal F1. 6F10 fue similar.

#### 4.4.2.2. Anticuerpos monoclonales frente a *N. ceranae*.

##### a) Anticuerpo monoclonal F1. 7D2.

Debido a que el anticuerpo monoclonal F1. 7D2 reconoce específicamente las esporas de *N. ceranae*, al igual que en el caso de la IFI con el suero policlonal frente a *N. ceranae* (apartado 4.1.1.5.), se consideraron como positivas las colmenas en las que se detectó infección por esta especie o coinfección de ésta con *N. apis*.

En la tabla de contingencia se muestra la comparación entre los resultados de la PCR múltiple del CAR y la IFI con F1. 7D2 (Tabla 4.4.8.), y cómo las dos técnicas coincidieron en el diagnóstico de 164 colmenas (76 negativas y 88 positivas).

**Tabla 4.4.8.** Tabla de contingencia: PCR frente a IFI con F1. 7D2.

		IFI		TOTAL
		-	+	
PCR	-	76	10	86
	+	6	88	94
TOTAL		82	98	180

+ = Presencia de *N. ceranae*.

Con el análisis estadístico se obtuvo un valor de *Chi* cuadrado de 121,723 ( $p \leq 0,05$ ) y un Índice de Concordancia muy bueno ( $\kappa = 0,822$ ) según la escala de Altman (Tabla 4.1.10.).

La comparación de la MO con la PCR de referencia, tomando como positivas aquellas colmenas con esporas de *N. ceranae*, ya se ha realizado en el apartado 4.1.1.5. (Tabla 4.1.11.). En dicha comparación se observó una correlación significativa con un valor de *Chi* cuadrado de 115,428 ( $p \leq 0,05$ ) y un Índice de Concordancia  $\kappa = 0,8$ , lo que la escala de Altman (1991) se relaciona con una concordancia buena (Tabla 4.1.10.). Las pequeñas diferencias entre la MO y la IFI en este caso se deben a que el número de colmenas en el que la MO ha coincidido con la PCR es ligeramente menor, 162 (79 positivas y 83 negativas).

##### b) Anticuerpo monoclonal F4. 1B11.

El anticuerpo monoclonal F4. 1B11, al igual que el policlonal y el monoclonal F1. 7D2, reconoce específicamente esporas de *N. ceranae*, por lo que el diseño del análisis estadístico fue el mismo que en el apartado anterior (apartado 4.4.2.2.a.), considerándose positivas aquellas colmenas infectadas por *N. ceranae*.

En la Tabla 4.4.9. se muestran los resultados obtenidos al comparar la técnica de IFI con la PCR múltiple, revelando la coincidencia entre las dos técnicas en 167 colmenas (79 negativas y 88 positivas), coincidencia que se corresponde con un valor de *Chi* cuadrado de 131,662 ( $p \leq 0,05$ ) y un  $\kappa = 0,855$  en el Índice de Concordancia, lo que Altman (1991) interpreta como una concordancia muy buena según los valores de su escala (Tabla 4.1.10.).

**Tabla 4.4.9.** Tabla de contingencia: PCR frente a IFI con F4. 1B11.

		IFI		TOTAL
		-	+	
PCR	-	79	7	86
	+	6	88	94
TOTAL		85	95	180

+ = Presencia de *N. ceranae*.

Con respecto a la microscopía óptica con contraste de fases (MO), observando la Tabla 4.1.11. (apartado 4.1.1.5.), en la que se comparan los resultados de esta técnica con los de la PCR múltiple, la MO coincidió con la PCR en 162 (79 positivas y 83 negativas), lo que se reflejó en un valor de *Chi* cuadrado de 115,428 ( $p \leq 0,05$ ) y un Índice de Concordancia  $\kappa = 0,8$ , que la escala de Altman (1991) traduce a una concordancia buena (apartado 4.1.1.5., Tabla 4.1.10.).

#### 4.4.2.3. Anticuerpo monoclonal F4. 9G2 frente a *N. apis*.

Finalmente, se estudió el anticuerpo monoclonal F4. 9G2, que reconoce específicamente *N. apis*. Por lo tanto, para el análisis estadístico de los resultados obtenidos con este anticuerpo se consideraron positivas aquellas colmenas en las que se detectó la presencia de *N. apis* o la coinfección con *N. ceranae*.

En la tabla de contingencia 4.4.10. se presentan los resultados obtenidos en el estudio comparativo de la PCR múltiple y la IFI.

En este caso, ambas técnicas coincidieron en el diagnóstico de 141 de las 180 colmenas estudiadas (94 negativas y 47 positivas). El análisis estadístico mostró que, aunque la comparación de proporciones mediante *Chi* cuadrado resultó significativa ( $Chi = 53,279$  con  $p \leq 0,05$ ) el análisis de concordancia presentó una valoración moderada ( $\kappa = 0,538$ , apartado 4.1.1.5., Tabla 4.1.10.) en la escala de Altman (1991).

**Tabla 4.4.10.** Tabla de contingencia: PCR frente a IFI con F4. 9G2.

		IFI		TOTAL
		-	+	
PCR	-	94	13	107
	+	26	47	73
TOTAL		120	60	180

+ = Presencia de *N. apis*.

Por otra parte, en el caso de la MO, en la tabla de contingencia de su comparación con la PCR múltiple (Tabla 4.4.11.) se puede observar que ambas técnicas coinciden en el diagnóstico de 155 colmenas (86 negativas y 69 positivas).

**Tabla 4.4.11.** Tabla de contingencia: PCR frente a MO.

		MO		TOTAL
		-	+	
PCR	-	86	21	107
	+	4	69	73
TOTAL		90	90	180

+ = Presencia de *N. apis*.

El análisis del índice de concordancia presentó un valor de *Chi* cuadrado de 97,363 ( $p \leq 0,05$ ) y la concordancia resultó buena con un índice de  $\kappa = 0,722$ , mostrando unos mejores resultados con respecto a los obtenidos en la IFI (Tabla 4.4.10.).

#### 4.4.2.4. Especificidad y sensibilidad de las distintas técnicas diagnósticas.

Una vez comparados los resultados de las técnicas de diagnóstico, se valoró la eficacia de la técnica de IFI desarrollada con los anticuerpos monoclonales, determinando sus parámetros de sensibilidad y especificidad al igual que se hizo con los anticuerpos policlonales (apartado 4.1.1.5.a.).

Para el estudio comparativo mediante el Test Diagnóstico se analizaron los resultados obtenidos en las tablas de contingencia (Tablas 4.4.6. a 4.4.11.) de los estudios comparativos entre las distintas técnicas: la IFI utilizando el suero policlonal y los anticuerpos monoclonales; la PCR múltiple descrita por el CAR y la MO con contraste de fases (apartados 4.4.2.1.; 4.4.2.2. y 4.4.2.3.).

**a) Especificidad y sensibilidad de la técnica de IFI con el anticuerpo monoclonal F1. 6F10 frente a *Nosema* spp.**

El anticuerpo monoclonal F1. 6F10 reconoce las dos especies de *Nosema* que parasitan a las abejas, *N. ceranae* y *N. apis*, característica que se tuvo en cuenta para realizar el Test Diagnóstico con los resultados obtenidos por la IFI, utilizando éste anticuerpo y por la MO (apartado 4.4.2.1.; Tablas 4.4.6. y 4.4.7.). Así se pudieron comparar la sensibilidad (probabilidad de detectar un verdadero positivo en una colmena infectada) y la especificidad (probabilidad de diagnosticar un verdadero negativo en una colmena sana) de ambas técnicas entre ellas y con respecto a la PCR múltiple.

**Tabla 4.4.12.** Porcentajes de sensibilidad y especificidad (Intervalo de Confianza) del Test Diagnóstico comparando la PCR frente a la MO y la IFI con F1. 6F10, frente a *N. apis* y *N. ceranae* (Nivel de confianza del 95%).

	PCR	IFI F1. 6F10	MO
<b>% Sensibilidad</b>	100	97,79 (94,96-100)	97,79 (94,96-100)
<b>% Especificidad</b>	100	93,18 (84,60-100)	95,45 (88,16-100)

En la Tabla 4.4.12. se muestran los resultados del Test Diagnóstico para las técnicas de IFI y MO en comparación con la PCR. En este caso, tanto la IFI como la MO presentaron la misma sensibilidad. En cambio, la IFI con F1. 6F10 muestra un porcentaje de especificidad algo inferior con respecto a la MO, aunque el intervalo de confianza obtenido con esta técnica también abarca hasta el 100%.

**b) Especificidad y sensibilidad de la técnica de IFI con los anticuerpos monoclonales frente a *N. ceranae*.**

**b.1) Especificidad y sensibilidad de la técnica de IFI con el anticuerpo monoclonal F1. 7D2.**

Al estudiar los resultados obtenidos en el Test Diagnóstico, realizado con la tabla de contingencia 4.4.8. (apartado 4.4.2.2.a.), se puede observar cómo la IFI utilizando el anticuerpo monoclonal F1. 7D2 presentó una sensibilidad mayor que la MO para la detección de *N. ceranae*, y sin embargo la especificidad fue mayor en el caso de esta última (Tabla 4.4.13.). Por último, ésta técnica obtuvo una sensibilidad y especificidad menores con respecto a la IFI que utiliza el anticuerpo policlonal (Tabla 4.4.13.).

**Tabla 4.4.13.** Porcentajes de sensibilidad y especificidad (Intervalo de Confianza) del Test Diagnóstico comparando la PCR frente a la MO y la IFI con el anticuerpo policlonal (Pc) y los anticuerpos monoclonales F1. 7D2 y F4. 1B11, frente a *N. ceranae* (Nivel de confianza del 95%).

	PCR	IFI (Pc)	IFI F1. 7D2	IFI F4.1B11	MO
<b>% Sensibilidad</b>	100	94,68 (89,61-99,75)	93,62 (88,14-99,09)	93,62 (88,14-99,09)	88,30 (81,27-95,33)
<b>% Especificidad</b>	100	95,35 (90,32-100)	88,37 (81,02-95,73)	91,86 (85,50-98,22)	91,86 (85,50-98,22)

**b.2) Especificidad y sensibilidad de la técnica de IFI con el anticuerpo monoclonal F4. 1B11.**

Como puede observarse en la tabla 4.4.13., los resultados del Test Diagnóstico para la IFI con el anticuerpo F1. 1B11, calculados con la tabla de contingencia 4.4.9 (apartado 4.4.2.2.b.) muestran cómo dicha técnica presentó una sensibilidad mayor que la MO, igualando la especificidad de la misma. Por otro lado, al comparar su sensibilidad y especificidad con la de las otras dos IFI para el diagnóstico de *N. ceranae*, vemos que la presente reveló una mejora con respecto a la que utiliza el anticuerpo F1. 7D2 ya que, a pesar de presentar la misma sensibilidad, aumentó su porcentaje de especificidad. Aún así, al igual que la IFI con F1. 7D2, ambos porcentajes (sensibilidad y especificidad) fueron menores que los obtenidos con el anticuerpo policlonal.

**c) Especificidad y sensibilidad de la técnica de IFI con el anticuerpo monoclonal F4. 9G2 frente a *N. apis*.**

Debido a la especificidad del anticuerpo monoclonal F4. 9G2 frente a *N. apis*, la prueba del Test Diagnóstico se realizó con las tablas de contingencia que tenían en cuenta dicha especificidad (apartado 4.2.2.3.; Tablas 4.4.10. y 4.4.11.), y con las que se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 4.4.14.):

**Tabla 4.4.14.** Porcentajes de sensibilidad y especificidad (Intervalo de Confianza) del Test Diagnóstico comparando la PCR frente a la MO y la IFI con el anticuerpo monoclonal F4.9G2 frente a *N. apis* (Nivel de confianza del 95%).

	PCR	IFI F4. 9G2	MO
<b>Sensibilidad %</b>	100	64,38 (52,71-76,05)	94,52 (88,62-100)
<b>Especificidad %</b>	100	87,85 (81,19-94,51)	80,37 (72,38-88,37)

La tabla muestra como la IFI con el anticuerpo monoclonal F4. 9G2 presentó unos porcentajes de sensibilidad bajos, no solo con respecto a la PCR múltiple, la técnica de referencia, sino también a la MO. No obstante, esta técnica de IFI mostró una mayor especificidad que la MO al identificar *N. apis*.

## 5. DISCUSIÓN.

Los insectos polinizadores tienen una gran influencia sobre las relaciones ecológicas, la conservación y la estabilidad del ecosistema. Los polinizadores facilitan la variación genética en la comunidad vegetal, así como la diversidad floral, su especialización y su evolución. Por otro lado, en los ecosistemas agrícolas los polinizadores son vitales para la producción agraria, ya que más del 35% de la producción mundial y un 87% de los principales cultivos alimentarios en el planeta, así como un elevado número de medicamentos derivados de plantas, dependen de su actividad (Bernal y col., 2011).

Aparte del importante papel de las abejas en la mayoría de los ecosistemas terrestres, estos insectos son también de gran importancia económica, al ser la base de la industria apícola. Por ejemplo, España es el país mediterráneo que posee un mayor número de colmenas de abejas (más de 2,5 millones en el año 2009) y el que presenta las mayores tasas de producción de miel (Higes y col., 2010a), lo que pone en evidencia la necesidad del mantenimiento de sus poblaciones en condiciones sanitarias adecuadas.

Recientemente, en muchos lugares de todo el mundo las colmenas de *Apis mellifera* han sufrido la repentina desaparición de sus abejas sin una explicación aparente. Este fenómeno se ha denominado en Europa como el síndrome de despoblamiento de las colmenas (*Colony Depopulation Syndrome* o CDS) y en Estados Unidos se conoce como el "desorden del colapso de las colmenas" (*Colony Collapse Disorder* o CCD). Hasta la fecha, se sospecha que los posibles causantes del síndrome pueden ser bien parásitos como el ácaro *Varroa destructor* o el microsporidio *Nosema ceranae*, bien ciertas enfermedades virales, o bien las interrelaciones entre todos estos organismos, y de éstos con otros agentes externos como las prácticas agrícolas, la destrucción del hábitat o la influencia de los insecticidas presentes en el medio. Hasta ahora, sin embargo, no se ha llegado a un consenso al respecto (Bernal y col., 2011).

Aparte de su posible implicación en el síndrome de despoblamiento de las colmenas, las microsporidiosis causadas por el género *Nosema* en las abejas adultas son enfermedades muy extendidas que provocan importantes pérdidas económicas para los apicultores de todo el mundo. Existen dos especies de microsporidios que infectan a *Apis mellifera*: *N. ceranae* y *N. apis*.

Desde que se descubrió *N. apis* hace cien años, se ha descrito su elevada prevalencia en colmenares profesionales tanto en Europa como en Estados Unidos (Bailey, 1981). Hasta hace relativamente poco tiempo, todas las infecciones causadas por *Nosema* en colmenas de abejas europeas (*Apis mellifera*) se atribuían a esta especie. Sin embargo, en 2005 se describió la presencia de *N. ceranae* infectando estas abejas en Europa y Asia (Higes y col., 2006; Huang y col., 2007), y más tarde a lo largo de todo el mundo (Higes y col., 2010b). Estos descubrimientos



demonstraron que *N. ceranae*, que previamente se pensaba que estaba restringida a su hospedador *Apis cerana* (abeja asiática), actualmente también infecta *Apis mellifera*.

La infección por *N. ceranae* presenta una estacionalidad distinta a la de *N. apis*, causando problemas importantes a los apicultores de climas templados, principalmente en los meses de verano. Las infecciones causadas por ambas especies de *Nosema* derivan en una disminución de la producción de miel y de la actividad pecoreadora, lo que conlleva la reducción de la productividad polinizadora. Sin embargo, mientras que los síntomas de la nosemosis causada por *N. apis* se observan fácilmente en las colonias, mostrando un elevado número de abejas muertas y manchas diarreicas en las entradas de las colmenas, los síntomas producidos por *N. ceranae* son menos claros, consistiendo principalmente en un crecimiento pobre de la colonia y un despoblamiento de la misma. Como las abejas individualmente no presentan individualmente ningún signo externo de infección, es necesario el desarrollo de métodos que permitan una identificación rápida de la misma para permitir a los apicultores un mejor control de la enfermedad y una optimización de las condiciones de tratamiento (Mo y Drancourt, 2004; Higes y col., 2010b) .

Dado que el tipo y pronóstico de la enfermedad que desarrollen las abejas dependerá de la especie de *Nosema* que las infecte, es importante la identificación especie-específica. Las esporas de *Nosema* spp. se pueden identificar por microscopía óptica (MO), pero para poder diferenciar las dos especies se debe realizar un estudio morfológico detallado de las esporas mediante microscopía electrónica de transmisión (MET), técnica que además de ser tediosa y de elevado coste, al utilizar muestras de tejido aleatorias, puede no ser lo suficientemente sensible como para detectar un número pequeño de esporas (Mo y Drancourt, 2004).

Así mismo, se han descrito distintas técnicas moleculares para el diagnóstico y la identificación de *N. apis* y *N. ceranae*, de manera que se han desarrollado protocolos de PCR simple que utilizan cebadores especie-específicos (Chen y col., 2008; Nabian y col., 2011; Suwannapong y col., 2011) o de PCR múltiple para la amplificación del ADN de las dos especies simultáneamente (Martin-Hernandez y col., 2007). También se han publicado protocolos de PCR-RFLP (Higes y col., 2006; Klee y col., 2007; Giersch y col., 2009; Tapaszti y col., 2009; Stevanovic y col., 2011), así como de PCR cuantitativa y en tiempo real, los cuales no sólo permiten la identificación de ambas especies simultáneamente sino además la determinación de la carga parasitaria de las mismas (Cox-Foster y col., 2007; Chen y col., 2009a; Bourgeois y col., 2010; Forsgren y Fries, 2010; Hamiduzzaman y col., 2010; Traver y Fell, 2011; Copley y Jabaji, 2012; Martinez y col., 2012).

Sin embargo, los métodos moleculares requieren infraestructura y personal especializados, por lo que a menudo suponen un elevado coste. Además, se ha demostrado que la eficiencia de la PCR puede variar para un mismo par de cebadores al utilizarlo en condiciones distintas (distintos protocolos de amplificación) o con distintos reactivos (polimerasa, magnesio, etc.) (Erler y col., 2012).

Por otro lado, algunos autores han demostrado diferencias en la sensibilidad y la especificidad de distintos cebadores que amplificaban para determinadas especies de *Nosema* (Stevanovic y col., 2011; Erler y col., 2012) llegando este último a recomendar el uso de distintos pares de cebadores en función de la aplicación de los mismos: los de mayor especificidad para el diagnóstico diferencial, y los de mayor sensibilidad para determinar la intensidad de la infección en el hospedador.

Considerando todo lo expuesto, sería conveniente el desarrollo de una técnica alternativa a las de microscopía y las moleculares, que resulte más económica, menos laboriosa y permita una identificación diferencial sensible y específica de *N. ceranae* y *N. apis*, las dos especies causantes de la nosemosis en *Apis mellifera*.

Con respecto a las técnicas inmunológicas, la utilización de la inmunofluorescencia indirecta (IFI) para una detección específica de especie se vio bastante limitada hasta la producción de anticuerpos poli y monoclonales frente a varias especies de microsporidios en los últimos años, la que ha simplificado y mejorado dicha detección en muestras clínicas (Didier y Weiss, 2006).

En el caso de los anticuerpos policlonales, como ya se ha mencionado en la introducción, el mayor esfuerzo se ha realizado sobre las especies que afectan al hombre. Se han producido sueros inmunes frente a *Nosema corneum* (Aldras y col., 1994) y sobre todo frente a *Encephalitozoon hellem* (Schwartz y col., 1992; Weber y col., 1993; Aldras y col., 1994), *E. cuniculi* (De Groote y col., 1995; Delbac y col., 1998; Sobottka y col., 2001), *E. intestinalis* (Visvesvara y col., 1994; Visvesvara y col., 1995; Sodré y col., 1997; Bornay-Llinares y col., 1998; Moura y col., 1999; Sobottka y col., 2001) y *Enterocytosoon bienewisi* (Didier y col., 1991; Visvesvara y col., 1991; Kucerova y col., 2004; Sheoran y col., 2005a). Por otra parte, también se han producido anticuerpos policlonales frente a microsporidios que parasitan peces como *Glugea atherinae* (Delbac y col., 1998).

Existe un solo caso en el que se ha descrito la producción de anticuerpos policlonales frente a *N. ceranae* utilizando tecnología genómica de anticuerpos (*Genomic Antibody Technology* o GAT) por la que un plásmido que contiene la secuencia de ADN que codifica para la proteína de interés (*N. ceranae* en este caso) se inocula a un animal para que éste la exprese *in vivo*, la reconozca como extra a y produzca anticuerpos frente a ella (Aronstein, 2010).

Por otro lado, los anticuerpos monoclonales (AcMc) han demostrado su utilidad para la identificación rápida y específica de los microsporidios en el diagnóstico de rutina de los mismos (Mo y Drancourt, 2004). Se han desarrollado AcMc frente a varias especies de microsporidios debido a su importante impacto sanitario en el hombre, como es el caso de *Enterocytosoon bienewisi* (Weiss y col., 1992; Zierdt y col., 1993; Accoceberry y col., 1999; Achbarou y col., 1999; Sorel y col., 2003; Sheoran y col., 2005a; Sheoran y col., 2005b; Zhang y col., 2005; Reetz y col., 2009), *Encephalitozoon cuniculi* (Aldras y col., 1994; Keohane y col., 1994; De Groote y col., 1995;

Croppo y col., 1997; Delbac y col., 1998; Enriquez y col., 1998; Bohne y col., 2000; Franzen y col., 2004; Mo y Drancourt, 2004; Sak y col., 2006; Furuya y col., 2008), *E. hellem* (Aldras y col., 1994; Croppo y col., 1994; Visvesvara y col., 1994; Enriquez y col., 1997; Croppo y col., 1998; Enriquez y col., 1998; Lujan y col., 1998; Mo y Drancourt, 2002) y *E. intestinalis* (Visvesvara y col., 1995; Beckers y col., 1996; Bornay-Llinares y col., 1998; del Águila y col., 1998; Enriquez y col., 1998; Lujan y col., 1998; Achbarou y col., 1999; Prigneau y col., 2000; Hayman y col., 2001; Thellier y col., 2001; Bouladoux y col., 2003; Reetz y col., 2009).

También se han desarrollado AcMc frente a microsporidios cuya importancia viene dada por su impacto económico, ya que afectan a especies importantes en acuicultura, como *Glugea americanus* (Keohane y col., 1994; Keohane y col., 1996) y *G. atherinae* Pomport-Castillon y col., 1997), *Nosema locustae* en agricultura (Knoblett y Youssef, 1996; Keohane y col., 2001) y *N. bombycis* en la sericultura (Shamim y col., 1997; Li y col., 2007; Zhang y col., 2007; Li y col., 2009). Sin embargo, hasta la fecha no se ha descrito el desarrollo de AcMc frente a las especies de microsporidio que parasitan a las abejas, *N. ceranae* y *N. apis*.

Teniendo en cuenta todo lo expuesto, el objetivo fundamental de esta tesis consistió en el desarrollo, la producción y la caracterización de anticuerpos policlonales y monoclonales que facilitaran la detección *N. ceranae* y *N. apis*, así como la puesta a punto de una técnica de IFI utilizando dichos anticuerpos, que permita el diagnóstico diferencial de ambas especies.

### **5.1. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES FRENTE A *N. ceranae* Y *N. apis*.**

El primer paso para el desarrollo de la técnica de IFI fue la obtención de antisueros frente a *N. ceranae* y *N. apis*. Con este fin se inocularon cuatro conejos Nueva Zelanda, con esporas aisladas de colmenas infectadas suministradas por el CAR, dónde se identificaron como *N. apis* o *N. ceranae* mediante MO o PCR múltiple (apartados 3.1.1.1. y 3.1.1.2.).

El proceso o método de purificación de esporas de *Nosema* spp. varía en función del uso para el que éstas están destinadas. Después de la disección del tracto intestinal de las abejas, éste se homogeniza en agua destilada (Cantwell, 1970) o en agua del grifo (Fries y col., 1996) para realizar los recuentos de esporas, según recomienda la OIE (OIE, 2008). Para la homogenización se pueden utilizar morteros (Huang y col., 2007; Paxton y col., 2007), molinillos manuales (Higes y col., 2007; Strange y Calderone, 2009) u homogeneizadores automáticos (García-Palencia y col., 2010; Antúnez y col., 2012). Cuando se requiere una mayor pureza de las esporas, como en los experimentos con infecciones o en el diagnóstico por técnicas moleculares, el homogenizado puede filtrarse a través de mallas de nylon o metálicas que retengan restos indeseados (Malone y Stefanovic, 1999; Higes y col., 2007; Huang y col., 2007; Paxton y col., 2007), o incluso purificarse a través de una (Huang y col., 2007) o varias fases mediante gradiente de percoll cuando se van a realizar estudios moleculares (Cornman y col., 2009; Chen y col., 2009b).

Debido a que la pureza del antígeno es uno de los factores más importantes en el proceso de inmunización, se debe asegurar que no existan proteínas contaminantes que induzcan respuesta inmune indeseada (Cooper y Paterson, 1995). Por tanto, para la preparación de los inóculos de este estudio, se decidió realizar un tamizado de las esporas a través de una malla, y posteriormente una purificación mediante una fase de percoll isotónico al 95% (apartado 3.1.2.1.), obteniendo un rendimiento del 50% (apartado 4.1.1.1.).

Los protocolos de inmunización descritos recomiendan realizar una sangría previa a la inmunización, para asegurar que la respuesta inmune detectada en las siguientes sangrías es debida a dicha inmunización (Cooper y Paterson, 1995). Todos los conejos del estudio presentaron una leve reacción en la sangría a día cero, tanto frente a *N. apis* como a *N. ceranae*, pero en la mayoría de los casos ésta no afectaba al total de las esporas, por lo que no se consideró como título.

En las sangrías realizadas después de cada inóculo, los conejos inmunizados con *N. ceranae* (Conejos 1 y 2) alcanzaron títulos de 6400 y 1600 respectivamente (apartado 4.1.1.2., Tablas 4.1.2. y 4.1.3.). Hay que destacar que, en el caso del Conejo 2, el título podría haber sido mayor ya que no se completó el protocolo de inmunización por la muerte inesperada del animal. En cuanto a los conejos inmunizados frente a *N. apis* (Conejos 3 y 4) también se suspendió el protocolo de inmunización, en este caso debido a la baja titulación obtenida en el caso del Conejo 3 (apartado 4.1.1.2., Tablas 4.1.4.) y a la presencia de reacciones cruzadas frente a *N. ceranae* en ambos conejos (apartado 4.1.1.3.a., Tablas 4.1.4. y 4.1.5.).

En cuanto a las diferencias en el rango de títulos séricos alcanzados por los conejos inmunizados, dichas diferencias podrían justificarse por el hecho de que, cuando un animal se inmuniza con un determinado antígeno, elabora una respuesta con una producción y proliferación de múltiples clones de linfocitos, obteniéndose de su sangre un suero policlonal con una amplia variedad de anticuerpos de diferente especificidad y afinidad frente al antígeno inoculado (Goding, 1996). Se ha descrito que la especificidad de los anticuerpos que se producen puede variar ampliamente entre los distintos individuos inmunizados, dependiendo de los epítomos antigénicos dominantes que éstos reconozcan en el antígeno (Cooper y Paterson, 1995). Además, dado que la cepa de conejo utilizada no era consanguínea, una distinta expresión de los genes que regulan la respuesta inmune podría estimular respuestas diferentes en cada conejo. (Cooper y Paterson, 1995).

Por otro lado, en todos los antisueros obtenidos (frente a *N. ceranae* y frente a *N. apis*) se observaron reacciones cruzadas con la especie heteróloga de *Nosema*, algo habitual entre especies tan cercanas que comparten varios determinantes antigénicos comunes (Gool y col., 1997). En los antisueros frente a *N. ceranae*, la reacción frente a *N. apis* desaparecía a medida que el título aumentaba (apartado 4.1.1.2., Tablas 4.1.2. y 4.1.3.); sin embargo, contrariamente a lo esperado, en el caso de los sueros obtenidos frente a *N. apis* se observó una reacción de gran intensidad frente a *N. ceranae* en todas las diluciones, especialmente en el Conejo 4 (apartado 4.1.1.2., Tablas 4.1.4. y 4.1.5.). Este resultado podría deberse a que el determinante reconocido

fuera más inmunogénico y provocara una respuesta más fuerte que el antígeno con el que se inmunizó (Goding, 1980).

Otra posible razón de esta respuesta podría ser que en el inóculo administrado inicialmente se encontraran presentes esporas de ambas especies, *N. apis* y *N. ceranae*. Hay que recordar que las esporas utilizadas para los inóculos procedían del CAR, dónde se identificaban mediante MO con contraste de fases hasta que se puso a punto la técnica de la PCR múltiple (Martín-Hernández y col., 2007). Ya se ha mencionado con anterioridad que las esporas de microsporidios, y más concretamente las de *N. apis* y *N. ceranae*, son difíciles de diferenciar mediante MO como método de rutina (Fries y col., 1996). Por ello, si los resultados de la identificación mediante esta técnica de los lotes de esporas utilizados para la inmunización no se confirmó mediante la técnica de PCR, las esporas de ambas especies podrían estar presentes en el mismo inóculo.

En consecuencia, para el desarrollo del método de IFI, sólo pudieron utilizarse los sueros obtenidos frente a *N. ceranae* (Conejos 1 y 2). No obstante, de cara al futuro perfeccionamiento de la técnica de IFI, sería de gran utilidad poder disponer de nuevos sueros policlonales frente a *N. apis*, y así permitir la detección diferencial de las dos especies implicadas en la nosemosis de las colmenas de *A. mellifera* de forma simultánea, como ocurre en el caso de la PCR múltiple (Martín-Hernández y col., 2007).

Así pues, para el desarrollo de la IFI se seleccionó el antisuero obtenido en la última sangría (sangría a muerte) del Conejo 1 (C1SM), ya que fue el que alcanzó un título más elevado, y se utilizó a la dilución 1/1600 al no detectarse en ella reacción cruzada con *N. apis* y presentar una fluorescencia de gran intensidad (apartado 4.1.1.2., Tabla 4.1.2.).

Además del estudio de reacciones cruzadas frente a *N. apis*, también se estudiaron las reacciones cruzadas del suero policlonal C1SM frente a esporas de diferentes especies de microsporidios disponibles en el laboratorio: *E. intestinalis*, *E. cuniculi*, *E. hellem*, *E. bienewisi*, *V. corneae* y *A. algerae* (apartado 4.1.1.3.b.). En ninguno de los casos se observaron reacciones cruzadas, aunque sería conveniente realizar estudios posteriores con distintas especies del género *Nosema* sp.

Para la validación de la técnica de IFI con el suero policlonal C1SM para la detección de *N. ceranae* se estudiaron 180 muestras de colmenas infectadas por *N. ceranae* y/o *N. apis*, o libres de infección. Los resultados obtenidos con la IFI se compararon con aquellos resultados obtenidos para las mismas muestras mediante las técnicas de MO y PCR múltiple, utilizadas de rutina para el diagnóstico de *N. ceranae* y *N. apis* en el CAR. Estos resultados revelaron unos porcentajes de positivos y negativos muy similares en las tres técnicas (apartado 4.1.1.4., Tabla 3.9.), considerando positivas las colmenas coinfectadas por ambas especies y las infectadas sólo con *N. ceranae*, y negativas aquellas infectadas únicamente con *N. apis* o libres de infección.

A pesar de la similitud en los porcentajes, y al observar los resultados concretos de cada colmena obtenidos en el estudio comparativo de las tres técnicas (apartado 4.1.1.4., Tabla

4.1.6.), la MO proporcionó un diagnóstico fiable de la infección con *Nosema* sp., aunque no permitió una diferenciación clara entre especies, incluso para personal cualificado (Fries, 2010; Higes y col., 2010b). Estos resultados mostraron el hecho de que la mayoría de las muestras en las que la MO y la PCR difirieron, fueron aquellas en las que la PCR diagnosticó una coinfección de las dos especies en la colmena, y por lo tanto, resultó más difícil su identificación diferencial al utilizar la MO. Este hecho podría explicar las diferencias entre los porcentajes de positivos y negativos obtenidos por éstas técnicas. Conviene destacar el hecho de que los resultados analizados mediante MO fueron obtenidos por personal experimentado en la identificación diferencial entre *N. apis* y *N. ceranae*, por lo que quizá cabría esperar mayores diferencias en los porcentajes de positivos y negativos con respecto al diagnóstico mediante la PCR si se hubieran realizado en cualquier otro laboratorio.

En algunas muestras, la PCR múltiple detectó la presencia de *N. apis* y/o *N. ceranae* cuando la MO y la IFI no detectaron infección, lo que demostraría que la PCR es una técnica de mayor sensibilidad para el diagnóstico, ya que permite una detección aun con cargas parasitarias muy bajas (Weiss y Vossbrinck, 1999). De todas formas, hay que resaltar que la IFI detectó la presencia de *N. ceranae* en colmenas en las que la PCR múltiple no pudo. Este hecho podría deberse a que las esporas, al extruir su material genético en la fase de infección, estarían vacías en el momento del diagnóstico (Martínez Fernández, 1995). En este caso, como la IFI detecta antígenos de la superficie de la exospora, no presenta este problema.

Analizando las tablas de contingencia construidas para el análisis estadístico (apartado 4.1.1.5., Tablas 4.1.9. y 4.1.11.), los resultados de la MO también mostraron una menor concordancia con la PCR múltiple (11 falsos negativos y 7 falsos positivos) que los obtenidos con la IFI, que presentaron una concordancia más elevada (5 falsos negativos y 4 falsos positivos). Según éstos resultados, el diagnóstico de la IFI coincidiría en mayor grado con los resultados obtenidos por la PCR múltiple, que ha sido considerada el patrón de oro en los análisis realizados.

La prueba de Test Diagnóstico que se realizó sobre los datos obtenidos en el presente trabajo trata de determinar cómo se ajustarían a la situación real los resultados obtenidos con la IFI que se está validando. Para ello, es preciso conocer esa realidad mediante algún método completamente fiable (Molinero, 2002). Las técnicas más utilizadas por su mayor fiabilidad para el diagnóstico de microsporidios, y más concretamente para el de *N. apis* y *N. ceranae*, son las técnicas moleculares (Fries, 2010; Higes y col., 2010b). Para este estudio, la técnica de referencia con la que comparamos nuestros resultados fue la PCR múltiple desarrollada en el CAR por Martín-Hernández (2007), método que se utiliza rutinariamente para el diagnóstico de los dos parásitos en este centro.

Con el análisis estadístico de los resultados mediante el Test Diagnóstico (apartado 4.1.1.5.a., Tabla 4.1.12.) se observó que, a pesar de que la técnica de MO mostró resultados en concordancia con los obtenidos por la PCR múltiple (compartiendo un 88,17% de sensibilidad y un 90,8% de especificidad), la IFI proporcionó resultados aún más parecidos a los de la PCR de

referencia (94,62% y 90,80% sensibilidad y especificidad respectivamente). Esto significaría que el método de IFI puesto a punto con el suero policlonal (C1SM) presentó una sensibilidad y especificidad muy parecidas a las de la técnica de la PCR múltiple.

Tras el estudio de los resultados obtenidos, la IFI empleando el suero policlonal obtenido en el este trabajo se confirmaría como una técnica para el diagnóstico diferencial entre *N. ceranae* y *N. apis* en las colmenas de abejas alternativa a la MO, que presenta una menor sensibilidad y especificidad y que requiere un alto grado de especialización. De igual modo, al reflejar una sensibilidad y especificidad similares a las de la PCR múltiple, esta IFI podría utilizarse como técnica complementaria a la misma para una mejor detección e identificación de las distintas especies de parásito, o incluso resultar una alternativa de utilidad, especialmente en aquellos laboratorios en los que la técnica molecular no resulte de fácil acceso por los inconvenientes antes citados (Fries y col., 1996).

## **5.2. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A *N. ceranae*.**

Generalmente, a pesar de que los sueros policlonales son de fácil producción y de bajo coste, presentan ciertas desventajas, como el hecho de que se requiera de antígenos purificados para su producción, obteniéndose normalmente títulos bajos. Por otro lado, la disponibilidad se limita al animal inmunizado y no es reproducible en otro animal, aún administrando un mismo antígeno. Además, el suero policlonal que se obtiene es una mezcla heterogénea de anticuerpos que presentan distinta especificidad frente al antígeno deseado (Goding, 1996).

Estos problemas se solventan al utilizar anticuerpos monoclonales (AcMc), los cuales presentan una elevada especificidad no solo frente al antígeno empleado en la inmunización, sino también frente a una región particular dentro del mismo (determinante antigénico). Aunque el desarrollo y la obtención de AcMc resulten procesos más largos y costosos, la posibilidad de immortalizar clones de células formadoras de anticuerpos (hibridomas), derivados de la proliferación de una única célula (monoclonales), permite la producción y purificación ilimitadas de anticuerpos con una monoespecificidad definida y homogénea. Por lo tanto, una vez se aísle y se establezca el clon deseado, este podrá mantenerse indefinidamente con una variación nula entre los lotes de sobrenadantes (Goding, 1996).

Por todo lo expuesto anteriormente, y tras las observaciones realizadas en la obtención de anticuerpos policlonales, con el fin de optimizar el diagnóstico diferencial entre *N. ceranae* y *N. apis*, se procedió a la obtención de AcMc, por lo que se llevó a cabo la inmunización de ratones BALB/c con esporas purificadas de *N. ceranae*. Las esporas procedentes del Centro Apícola Regional (CAR) se procesaron en las mismas condiciones descritas para la obtención de anticuerpos policlonales ya que, aunque en el caso de la producción de AcMc la purificación

no es un requerimiento imprescindible, la inmunización con un antígeno purificado aumenta la proporción de hibridomas que secreten los anticuerpos deseados (Yokoyama, 1995).

En la selección del modelo animal para la obtención de AcMc se busca una elevada histocompatibilidad entre el mieloma (de origen múrido) y el esplenocito (Linfocito B), con el fin de obtener hibridomas productores estables tras la fusión (apartado 3.2.1.3.). Se ha descrito la utilización de varios modelos animales filogenéticamente próximos al ratón, como la rata, el hámster o el conejo (Yokoyama, 1995). Sin embargo, la mejor opción como modelo animal es el ratón, por la facilidad en su manejo y porque en el caso de los AcMc múridos el proceso de purificación es menos complejo que con otras especies, además de existir una gran variedad de controles y reactivos disponibles en el mercado para su posterior caracterización (Yokoyama, 1995).

En este trabajo se utilizaron ratones BALB/c, la cepa de ratones más recomendada, ya que la línea de mieloma de la que se disponía para las fusiones (P3X63-Ag8.653) está inducida en esta cepa. De este modo, los hibridomas que resultan de la fusión tendrán un único origen BALB/c y podrán crecer en un ratón BALB/c para la producción de líquido ascítico. Además, los bazo de los ratones de esta cepa son de un tamaño mayor que los de otras cepas de ratones, por lo que habrá más esplenocitos disponibles para la fusión, aumentando la probabilidad de obtener un número mayor de hibridomas (Yokoyama, 1995).

Los protocolos de inmunización descritos para la producción de AcMc pueden presentar diferencias pero, en general, éstos incluyen una inmunización inicial seguida de una dosis de recuerdo de 10 a 14 días después, y otra tres o cuatro días antes de la fusión celular. La mayoría de los inóculos se realizan intraperitonealmente, obteniendo unos buenos resultados, aunque algunos autores inmunizan vía intravenosa cuando no utilizan adyuvante. En este trabajo, a pesar de no utilizar adyuvante, la vía intravenosa se descartó ya que se ha descrito que en algunos casos estas inyecciones pueden producir reacciones sistémicas fatales para el animal (Yokoyama, 1995).

Durante el desarrollo del protocolo de inmunización, se estudió mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) la evolución de los títulos séricos en cada uno de los días de sangría (apartado 4.2.2.1.a.; Figura 4.1.). Todos los sueros se titularon tanto frente a *N. ceranae* (especie homóloga) como a *N. apis* (especie heteróloga), para detectar posibles reacciones cruzadas entre ambas especies. El título sérico de la mezcla de todos los sueros del lote frente a *N. ceranae* fue aumentando gradualmente en las sucesivas sangrías (apartado 4.2.2.1.a.; Tabla 4.2.1. y Figura 4.2.), hasta alcanzar un máximo de 3200 en la última (S4).

Con respecto a los resultados obtenidos en el estudio de reacciones cruzadas, estos mostraron una fuerte reacción frente a *N. apis* en la tercera sangría (S3; apartado 4.2.2.1.a.; Tabla 4.2.1. y Figura 4.2.), que alcanzó un título de 3200 y que, sin embargo, descendió en la S4 de manera que no afectaba al total de las esporas. La presencia de reacciones cruzadas, como se comentó anteriormente, podría deberse a distintos factores (apartado 5.1.). Sin



embargo en este caso, el hecho de que la reacción cruzada sea tan intensa y aparezca sólo en una de las sangrías (S3), podría indicar que en el inóculo correspondiente a dicha sangría estarían presentes esporas de *N. apis* que no se detectaron a la hora de clasificarlas para la preparación del inóculo.

Esta explicación también podría justificar los resultados obtenidos en el estudio del título sérico de los ratones que recibieron inóculos de recuerdo (apartado 4.2.2.1.a.; Tabla 4.2.2.). Éstos mostraron una reacción cruzada frente a *N. apis* (título de 1600) mayor que la de aquellos ratones que, debido a la limitación en la disponibilidad de antígeno, no recibieron dosis de recuerdo y presentaron un título de 400.

Uno de los pasos previos para la realización de las fusiones celulares fue la preparación de una capa o sustrato de alimentación (*feeder layer*), tanto en las placas de fusión como en las de clonaje y expansión de híbridos (apartado 3.2.2.3.b.2). Este sustrato produce un medio condicionado que proporciona las condiciones óptimas para el crecimiento de los hibridomas y mejora la eficiencia de los clonajes (Yokoyama, 1995). Algunos autores mantienen que los linfocitos crecen lentamente o incluso mueren cuando se encuentran en bajas concentraciones, debido al requerimiento de ciertos factores de crecimiento y al efecto tóxico de ciertos productos que se encuentran en los recipientes de cultivo. Por lo tanto, al cultivar los híbridos junto con una población de células de crecimiento lento o sin crecimiento (en nuestro caso timocitos de ratones BALB/c) como sustrato de alimentación, éstas aportarían los factores de crecimiento necesarios (particularmente IL-6) y, por otro lado, la renovación del medio de cultivo para su mantenimiento favorecería la eliminación de los productos potencialmente tóxicos que podrían interferir en el crecimiento de los híbridos (Goding, 1996).

Además de los timocitos, algunos autores recomiendan como capa de alimentación otras líneas celulares como los esplenocitos (las propias células de la fusión a una concentración suficiente también podrían actuar como sustrato) o células procedentes de lavados peritoneales (linfocitos y macrófagos) (Goding, 1996). Hay que destacar que se requieren unas condiciones de esterilidad óptimas para la extracción y preparación de los timocitos como capa de alimentación, ya que la utilización directa de células recién aisladas podría ser una fuente de contaminación de los cultivos celulares. Para evitar este problema se ha descrito la suplementación del medio de cultivo con sobrenadantes procedentes de suspensiones de timocitos filtrados en esterilidad (Yokoyama, 1995).

Durante las seis fusiones llevadas a cabo (apartado 4.2.3.1.; Tabla 4.2.3.) se calcularon los porcentajes de crecimiento en placa, los cuales variaron dentro de un rango del 65% aproximadamente (Fusión 6) hasta casi un 100% de los pocillos (Fusión 3). Estos porcentajes son superiores al rango del 50-60% de crecimiento descrito en la bibliografía (Yokoyama, 1995), lo que puede deberse a que, en nuestro caso, el producto de las fusiones celulares se ajustó a una concentración final cercana al máximo recomendado para el número de placas preparadas

con capa de alimentación (timocitos). En cada fusión se empleó un máximo de diez placas, un número razonable que permitiera un correcto seguimiento y mantenimiento de las mismas.

Para la selección de los híbridos productores del AcMc deseado en las distintas fusiones celulares, la prueba de ELISA llevada a cabo no ofreció unos resultados que permitieran un correcto cribado. Se ha descrito como al emplear en dicha técnica sueros policlonales y sobrenadantes de cultivo, éstos producen un elevado ruido de fondo en las lecturas, mostrando falsos positivos aun cuando la placa no está sensibilizada con antígeno. La razón no está completamente clara, pero puede estar relacionada con la afinidad de las IgM a unirse inespecíficamente a las placas, incluso después de postapizarlas con albúmina (Goding, 1996). Aldras y col. (1994) describieron como los AcMc del isotipo IgM que habían obtenido frente *Encephalytozoon hellem* no resultaron aptos para la técnica de ELISA, dada la elevada inespecificidad que presentaban en su cribado.

Teniendo en cuenta lo comentado anteriormente, para la selección y cribado de los híbridos secretores obtenidos en las fusiones celulares se decidió utilizar la técnica de IFI, un método de cribado muy utilizado dado que presenta una sensibilidad similar a la del ELISA. Además es un método rápido y permite el cribado de un elevado número de muestras diarias, ya que su visualización es fácil y consume poco tiempo (Goding, 1996).

Mediante la técnica de IFI se pudo determinar que, en aquellos pocillos que presentaban crecimiento celular, los porcentajes de híbridos positivos productores de AcMc frente a *N. ceranae* en cada una de las fusiones ocuparon un rango entre el 5,1 % (Fusión 5) hasta el 23,2% (Fusión 4), valores superiores a los descritos por otros autores (1-5%) (Yokoyama, 1995). La elevada presencia de pocillos positivos podría deberse a la presencia de falsos positivos (Yokoyama, 1995) o también, a la elevada concentración celular en los pocillos, la cual incrementaría la probabilidad de obtener híbridos secretores.

Tras el cribado de todas las fusiones celulares, se seleccionaron para su posterior clonaje y caracterización un total de cuatro híbridos productores por su intensa reacción frente al antígeno homólogo, así como por su estabilidad en la producción de del AcMc. Estos híbridos fueron el F1. 7D2 y el F4. 1B11 productores de anticuerpos específicos frente a *N. ceranae*, F4. 9G2 frente a *N. apis* y F1. 6F10 que reconoce las dos especies simultáneamente (apartado 4.2.3.1.; Figuras 4.3. y 4.4.).

Con respecto a los clonajes (apartado 4.2.3.2.; Tablas 4.2.4.; 4.2.5.; 4.2.6. y 4.2.7.), a pesar de que la eficiencia en la producción de AcMc de los hibridomas primarios suele ser relativamente pobre (Yokoyama, 1995), se obtuvieron porcentajes de crecimiento y positividad altos desde el primer clonaje. Se realizaron al menos tres clonajes de cada híbrido seleccionado para garantizar la monoespecificidad y evitar un sobrecrecimiento de los hibridomas no productores (Goding, 1996).

Tanto los híbridos positivos procedentes de las placas de fusión como los clones seleccionados de cada híbrido se expandieron y se congelaron en varias alícuotas (apartado 3.2.2.3.b.6.). Dado que a partir de los clones criopreservados siempre es posible recuperar la línea de un hibridoma una vez establecido, en todos los pasos del protocolo de obtención de AcMc deben congelarse aquellas células que se consideren importantes, para así evitar pérdidas en caso de que se produzcan contaminaciones de los cultivos celulares o algún error en la técnica (Cebrían, 1985).

Así mismo, se obtuvieron sobrenadantes saturados de los AcMc seleccionados (apartado 3.2.2.3.b.7.), los cuales se producen con relativamente poco esfuerzo y en pocos días, pero presentan el inconveniente de contener una concentración de AcMc relativamente baja y en volúmenes pequeños. Existen métodos de cultivo *in vitro* para producir AcMc a gran escala, como por ejemplo los métodos de cultivo en lotes o los basados en membranas semipermeables. Sin embargo, éstos deben utilizarse cuando es razonable y práctico ya, que requieren experiencia y medios especiales, además de suponer un elevado coste y requerir un mayor consumo de tiempo (NAP, 1999). La utilización de los sobrenadantes saturados obtenidos resultó de utilidad en los estudios preliminares para caracterizar las propiedades de los AcMc seleccionados (apartado 3.3.), evitando el tener que producirlos a gran escala (Yokoyama, 1995).

Otro método, que también se utilizó en este trabajo para la obtención de AcMc a una concentración mayor, fue su producción en un modelo *in vivo*. El líquido ascítico contiene una alta concentración del AcMc deseado, aunque no es una muestra homogénea de ese anticuerpo ya que también contiene proteínas del ratón y otras moléculas que pueden producir inespecificidad (Yokoyama, 1991, 1995; Goding, 1996; NAP, 1999). Para obtener una preparación homogénea se utilizan distintas técnicas de purificación, pero requieren un mayor esfuerzo y pueden desnaturalizar los anticuerpos, disminuyendo su actividad. Sin embargo, normalmente la concentración de anticuerpos obtenida en los líquidos ascíticos es suficiente como para no tener que llevar a cabo dicha purificación (NAP, 1999).

Durante el proceso de producción de las ascitis, algunos de los ratones produjeron líquido ascítico, tumores sólidos o ambos a la vez, independientemente del híbrido con el que fueron inoculados. Además, uno de los híbridos (F4. 1B11) no produjo líquido ascítico en ninguno de los ratones del lote, aún cuando se inocularon dos clones distintos del mismo. Este mismo comportamiento se ha descrito al inocular en condiciones similares (volumen y concentración del inóculo, cepa de ratón, etc.) un híbrido obtenido específicamente frente a *Encephalitozoon intestinalis* (Izquierdo, 2007).

### **5.3. CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES OBTENIDOS FRENTE A *Nosema* spp.**

La determinación de los isotipos de los anticuerpos monoclonales (AcMc) es parte de su caracterización inicial, debido a que éstos determinan muchas de las propiedades inmunológicas e immunoquímicas de los mismos. Además, las características estructurales de los distintos isotipos pueden influir, por ejemplo, en el método de purificación de los mismos (Hornbeck y col., 1991).

En el presente trabajo, para la determinación de los isotipos de las inmunoglobulinas secretadas por los híbridos seleccionados, se utilizó el kit *Pierce® Rapid Isotyping Kit with Kappa and Lambda-Mouse*, identificando en todos los casos el isotipo IgM de cadena ligera  $\kappa$  (apartado 4.3.1.).

Muchos autores han obtenido AcMc del isotipo IgM frente a diversas especies de microsporidios, como *Enterocytozoon bienewisi* (Accoceberry y col., 1999; Achbarou y col., 1999; Sheoran y col., 2005b; Zhang y col., 2005), *Encephalitozoon intestinalis* (Lujan y col., 1998), *E. cuniculi* (Delbac y col., 1998), *E. hellem* (Aldras y col., 1994; Lujan y col., 1998; Mo y Drancourt, 2002), *Nosema bombycis* (Shamim y col., 1997), *N. locustae* (Keohane y col., 2001), *Glugea atherinae* (Pomport-Castillon y col., 1997) y *G. americanus* (Keohane y col., 1994; Keohane y col., 1996).

Entre ellos, Aldras y col. (1994) proponen que los AcMc de isotipo IgM, al tener una estructura molecular pentamérica, amplificarían la señal al utilizarlos en las técnicas inmunológicas (en nuestro caso la IFI), favoreciendo su selección frente al isotipo IgG (monomérico) en el cribado y los posteriores clonajes.

Para continuar con la caracterización de los AcMc obtenidos, se estudió la reactividad y la especificidad de los mismos, titulando mediante la técnica de IFI tanto los sobrenadantes saturados como los líquidos ascíticos frente a la especie homóloga de *Nosema* que reconocen específicamente cada uno de ellos (apartado 4.3.2.).

Con respecto a los sobrenadantes saturados, el AcMc F1. 6F10 (de género) presentó una reactividad parecida frente a *N. ceranae* y *N. apis*, con títulos de 200 y de 100 respectivamente. Así mismo, los AcMc F1. 7D2 y F4. 1B11 (frente a *N. ceranae*) alcanzaron títulos de 200 y 50 respectivamente. Finalmente el AcMc F4. 9G2 presentó un título de 5 frente a *N. apis*, su especie homóloga (apartado 4.3.2.1.; Tabla 4.3.2.).

Los resultados obtenidos con los líquidos ascíticos mostraron que el AcMc F1. 6F10 presentó una mayor reactividad frente a *N. apis* (con un título de 6400) que frente a *N. ceranae* (título de 3200). La ascitis del AcMc F1. 7D2 alcanzó un título de 3200 frente a *N. ceranae*, mientras que el AcMc F4. 9G2 presentó un título de 1600 frente a *N. apis* (apartado 4.3.2.2.; Tabla

4.3.3.). Hay que recordar que el AcMc F4. 1B11 no produjo líquido ascítico, aun habiendo inoculado dos clones distintos del híbrido que lo produce.

Los resultados obtenidos corroboran el hecho de que la producción de AcMc *in vivo* genera mayores concentraciones de los mismos con respecto a los sobrenadantes saturados (Goding, 1996; NAP, 1999). Por esta razón, cuando la concentración de anticuerpos producidos *in vitro* no es suficiente y no se requiere una elevada pureza del AcMc, el líquido ascítico es la mejor opción (Yokoyama, 1991). Este hecho podría extrapolarse al caso particular del AcMc F4. 9G2 (frente a *N. apis*), cuyo sobrenadante saturado sólo alcanzó un título de 5 frente al título de 1600 de la ascitis, la cual aumentaría la sensibilidad en las técnicas de diagnóstico y permitiría su mayor aprovechamiento al poder utilizarla diluida.

Por otro lado, y en paralelo a la titulación de los sobrenadantes saturados y las ascitis, se evaluó la posible presencia de reacciones cruzadas de los mismos frente a distintos antígenos heterólogos. Desde el punto de vista del diagnóstico, y en el caso concreto de la nosemosis en las colmenas, es importante que los AcMc producidos no presenten reacciones cruzadas entre las dos especies de microsporidio que se encuentran infectando a las abejas: *N. ceranae* y *N. apis*.

En este aspecto hay que destacar que, aparte de presentar una elevada especificidad frente a su antígeno homólogo, ninguno de los sobrenadantes saturados de los AcMc específicos de *N. ceranae* (F1. 7D2 y F4. 1B11) presentaron reacción cruzada frente a *N. apis* (apartado 4.3.3.1.; Tablas 4.3.5. y 4.3.6.). No obstante, el sobrenadante saturado de F4. 9G2, cuyo antígeno homólogo es *N. apis*, si reveló una reacción débil frente *N. ceranae*. Como ya se ha señalado anteriormente (apartado 5.1.), dicha reacción cruzada con una especie cercana filogenéticamente es algo probable, ya que el AcMc podría estar reconociendo un epítipo común a ambas especies (Gool y col., 1997). Además, el hecho de que se utilice el sobrenadante sin diluir también aumenta la inespecificidad, cosa que se demuestra cuando la reacción cruzada desaparece en la primera dilución (dilución 1/5), permitiendo el diagnóstico diferencial (apartado 4.3.3.1.; Tabla 4.3.7.).

Al evaluar la reacción de los sobrenadantes saturados frente a las esporas de *Vittaforma corneae*, se detectó reacción de los cuatro AcMc, aunque en ninguno de los casos superó la primera dilución (dilución 1/25) (apartado 4.3.3.1.; Tablas 4.3.4.; 4.3.5.; 4.3.6. y 4.3.7.). El hecho de que *V. corneae* sea una nueva denominación (Silveira y Canning, 1995) de la previamente descrita *Nosema corneum* (Shadduck y col., 1990), podría justificar las reacciones cruzadas que presentan los AcMc, las cuales serían debidas al reconocimiento de ciertos determinantes antigénicos comunes al género *Nosema* (Gool y col., 1997). Podría darse la misma circunstancia en el caso de las reacciones presentadas por los AcMc frente a las esporas de *Ancaliia algerae* (apartado 4.3.3.1.; Tablas 4.3.4.; 4.3.5.; 4.3.6. y 4.3.7.), ya que dicha especie renombrada por Franzen y col. (2006) previamente se había cambiado al género *Brachiola* (Cali y col., 1998) desde su primera denominación como *Nosema algerae* (Vavra y Undeen, 1970).

Sin embargo esto no explicaría por qué los sobrenadantes saturados de los AcMc F1. 7D2, F4. 1B11 y F4. 9G2 reconocen *Encephalitozoon hellem* cuando se utilizan sin diluir (apartado 4.3.3.1.; Tablas 4.3.5.; 4.3.6. y 4.3.7.). Generalmente, los AcMc reaccionarían con antígenos muy relacionados estructural y/o secuencialmente con el antígeno diana, aunque en algunas ocasiones podrían reaccionar con otros antígenos que no muestran relaciones tan claras con éste (Yokoyama, 1995). Por tanto, sería necesario realizar un estudio pormenorizado, mediante técnicas de proteómica por ejemplo, que permita conocer el origen de esta reacción y los epítomos que estarían implicados en la misma.

Con respecto a los líquidos ascíticos, estos presentaron reacciones que los sobrenadantes saturados no habían presentado. Así, la ascitis del AcMc F1. 7D2 específico de *N. ceranae* reaccionó frente a *N. apis* (apartado 4.3.3.2.; Tabla 4.3.9.), y la del F4. 9G2, que reconocía específicamente *N. apis*, presentó reacción cruzada frente a *N. ceranae* (apartado 4.3.3.2.; Tabla 4.3.10.). En ambos casos la respuesta frente al antígeno heterólogo (títulos de 100 y 50 respectivamente) fue menor que la presentada frente al homólogo (3200 y 1600 respectivamente), lo que permitiría un diagnóstico diferencial de ambas especies al utilizar las ascitis de estos AcMc.

Por otra parte, las ascitis de los tres AcMc (F1. 6F10, F1. 7D2 y F4. 9G2) produjeron reacción frente a *E. intestinalis* (apartado 4.3.3.2.; Tablas 4.3.8.; 4.3.9. y 4.3.10.) y el F1. 6F10 reaccionó frente a *E. cuniculi* (apartado 4.3.3.2.; Tabla 4.3.8.), inespecificidades que no se habían observado con los sobrenadantes saturados y que podrían deberse a la composición heterogénea de los líquidos ascíticos (Yokoyama, 1991). Además, dado que el líquido ascítico posee elevadas concentraciones de anticuerpos con respecto a los sobrenadantes saturados (Goding, 1996; NAP, 1999), es de esperar que aparecieran las mismas reacciones inespecíficas mostradas por éstos últimos frente a *V. corneae*, *A. algerae* y *E. hellem*, esta vez con una mayor intensidad de fluorescencia (apartado 4.3.3.2.; Tablas 4.3.8.; 4.3.9. y 4.3.10.). Al hecho de que estas reacciones fueran de débiles a moderadas hay que sumar que ninguna de estas especies de microsporidio (*E. intestinalis*, *E. cuniculi*, *E. hellem*, *V. corneae* y *A. algerae*) se ha detectado infectando las colmenas de abejas, por lo que no deberían suponer un problema para el diagnóstico de la nosemosis. Podría considerarse la obtención de preparaciones purificadas de las ascitis sin dejar de tener en cuenta que los anticuerpos del isotipo IgM pueden desnaturalizarse con algunas técnicas de purificación *in vitro*, corriendo el riesgo de perder su actividad (NAP, 1999). En todo caso, la elección de diluciones en las que no se den reacciones cruzadas, manteniendo una buena intensidad de fluorescencia frente al antígeno homólogo, permite solventar el problema.

Con el fin de completar la caracterización de los AcMc se realizaron estudios mediante inmunoelectrotransferencia (Western Blot), probando los sobrenadantes saturados de los mismos frente a *N. ceranae* y *N. apis*, las dos especies que producen la nosemosis en las abejas de la miel.

El patrón de inmunorreconocimiento del AcMc F1. 6F10, que reacciona frente a las dos especies de *Nosema*, reveló un perfil de reconocimiento antigénico de la espora completa de *N. ceranae* comprendido en un rango de 150 a 17 kDa. Con respecto a *N. apis* presentó un patrón más reducido (de 96 a 8 kDa), en el que la mayoría de las bandas coincidían con aquellas observadas en el de *N. ceranae*, exceptuando las de 93, 33 y 8 kDa, presentes únicamente en el de *N. apis*.

Respecto a los AcMc específicos de *N. ceranae*, el AcMc F1. 7D2 presentó un perfil de inmunorreconocimiento frente a la espora completa de *N. ceranae*, dentro del rango comprendido entre los 134 y los 20 kDa. Así mismo, el patrón obtenido frente a *N. apis* presentó un rango que abarcó desde los 86 a los 8 kDa, en el que ninguna de las bandas reconocidas coincidió con las observadas frente a *N. ceranae*. Por otro lado, el AcMc F4. 1B11 frente a su antígeno homólogo reconoció un patrón de bandas entre los 145 y los 17 kDa. El perfil obtenido frente a su antígeno heterólogo, *N. apis*, mostró bandas cuyos pesos moleculares coincidían con los de las observadas frente a *N. ceranae*: 104, 93, 87, 86, 71, 33 y 29 kDa. Sin embargo, las bandas restantes se reconocieron exclusivamente en este patrón.

Por último, al probar el AcMc F4. 9G2 frente a la espora completa de su especie homóloga, *N. apis*, éste mostró un patrón de inmunorreconocimiento que abarcaba desde los 86 a los 8 kDa. Las bandas que reconoció frente a su antígeno heterólogo, *N. ceranae*, se hallan comprendidas entre los 134 a los 17 kDa. Hay que mencionar que en ambos perfiles presentaron la banda de 17 kDa de peso molecular.

El AcMc F1. 6F10 reconoce tanto *N. cerane* como *N. apis*. Sin embargo, F1. 7D2, F4. 1B11 y F4. 9G2, que son específicos de una sola especie, revelaron un patrón de inmunorreconocimiento tanto frente a la especie homóloga como a la heteróloga, sugiriendo un reconocimiento de epítomos compartidos entre las dos especies de *Nosema*. El hecho de que ninguno de los AcMc, excepto F4. 9G2, mostraran reacción cruzada frente a la especie heteróloga de *Nosema* al emplearlos en la IFI, y que sí lo hicieran cuando se utilizaron en el *Western Blot*, se podría justificar por la mayor sensibilidad y amplificación de la señal que caracterizan a esta última técnica. Además, hay que recordar que en la IFI se utilizaron diluciones de los sobrenadantes para disminuir la respuesta inespecífica, mientras que en el caso del *Western Blot* los sobrenadantes saturados se utilizaron directamente sin diluir.

Se han publicado estudios acerca de la composición peptídica de las proteínas que componen la pared de la espora en el género *Nosema* (Wang y col., 2007). Así mismo, se ha descrito la producción de anticuerpos poli y monoclonales frente a distintos antígenos de dicha pared (Li y col., 2007; Zhang y col., 2007). Gracias a estos estudios, hasta la fecha se han identificado y caracterizado cuatro proteínas pertenecientes tanto a la exospora (SWP32) como a la endospora (SWP25, SWP26, SWP30) (Li y col., 2009; Wu y col., 2009).

Wang y col. (2007) produjeron anticuerpos policlonales que presentaban un perfil de reconocimiento de tres bandas, con pesos moleculares de 71, 48 y 30 kDa, en la pared de la espora de *N. bombycis*. Hay que destacar que todos los anticuerpos monoclonales obtenidos en el presente trabajo reconocieron una banda de 71 kDa en la espora de *N. ceranae* y que, además, el AcMc F4. 1B11 también la reconoció frente a *N. apis*. Así mismo, tanto el AcMc F1. 6F10 (frente a *Nosema* sp.) como el F1. 7D2 y el F4. 1B11 (específicos de *N. ceranae*) reconocieron una banda de 49 kDa frente a *N. ceranae*, y todos reconocieron una banda de 29 kDa frente a *N. apis* excepto F1. 6F10, que junto con F4. 1B11 sí la reconoció frente a *N. ceranae*.

Por otra parte, Li y col. (2007) desarrollaron anticuerpos monoclonales frente a la espora de *N. bombycis* que reconocían bandas de 76, 54 y 26 kDa. Estas dos últimas bandas también fueron reconocidas por los AcMc obtenidos en este trabajo. Más concretamente, el F1. 6F10 reconoció la banda de 54 kDa en la espora completa de *N. ceranae* y el F4. 1B11 en la de *N. apis*. Así mismo, los AcMc F1. 6F10, F1. 7D2 y F4. 1B11 reconocieron una banda de 26 kDa frente a *N. ceranae*.

El hecho de que tanto los policlonales producidos por Wang y col. (2007) y los AcMc de Li y col. (2007) frente a *N. bombycis*, como los AcMc obtenidos en este trabajo frente a *N. ceranae* y *N. apis* estén reconociendo bandas con pesos moleculares similares, podría indicar la presencia de antígenos comunes a las tres especies de *Nosema*. Así mismo, el hecho de que las bandas reconocidas por los AcMc de este trabajo tengan pesos moleculares similares a los descritos para las distintas proteínas caracterizadas en la pared de la espora de *N. bombycis*, podría sugerir que dichas proteínas fueran un antígeno común del género *Nosema*. De este modo, la banda de 26 kDa reconocida por los AcMc F1. 6F10, F1. 7D2 y F4. 1B11 en la espora de *N. ceranae* podría relacionarse con la presencia de la proteína SWP26 (25,7 kDa), mientras que la de 33 kDa reconocida por todos los AcMc frente a *N. apis*, se correspondería con la SWP32 (32,7 kDa). Sin embargo, para corroborar este hecho habría que realizar estudios más detallados con ayuda de otras técnicas, como por ejemplo la proteómica.

#### **5.4. EVALUACIÓN DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES EN EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE *N. ceranae* y *N. apis*.**

Tras la caracterización de los anticuerpos monoclonales (AcMc), se realizó un estudio que permitiera la identificación diferencial entre *N. ceranae* y *N. apis* mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI).

Para este estudio se utilizaron los sobrenadantes saturados de los cuatro anticuerpos monoclonales a las diluciones 1/25 para los anticuerpos F1.6F10 y F4.1B11, 1/50 para el F1. 7D2 y 1/5 para el F4.9G2. Dichas diluciones se eligieron en función de la intensidad de la fluorescencia



(apartado 4.3.2.1.) y de la ausencia de reacciones cruzadas con otras especies (apartado 4.3.3.1.).

Al igual que en la validación de la IFI con los anticuerpos policlonales, los sobrenadantes saturados de los cuatro anticuerpos monoclonales se evaluaron frente a 180 muestras de colmenas en las que se determinó la presencia de nosemosis, bien producida por *Nosema* sp. (con el AcMc F1. 6F10), por *N. ceranae* (con F1. 7D2 y F4. 1B11) o por *N. apis* (con F4. 9G2). Así mismo, los resultados obtenidos se compararon con aquellos obtenidos para las mismas muestras en el Centro Apícola regional (CAR) mediante las técnicas de microscopía óptica (MO) y PCR múltiple.

El estudio comparativo de los porcentajes de colmenas positivas y negativas para la presencia de una o ambas especies de *Nosema* (presencia o ausencia de nosemosis), el anticuerpo monoclonal (AcMc) F1. 6F10 y la PCR múltiple revelaron los mismos resultados (apartado 4.4.1.1.; Tabla 4.4.1.), obteniéndose en el análisis estadístico una correlación con alto valor de significancia y una concordancia muy buena (apartado 4.4.2.1.). Esta similitud en los resultados podía ser predecible, ya que el tamaño de las esporas de *N. ceranae* y *N. apis* permite una buena identificación de las mismas al utilizar la técnica de MO, y muy especialmente con la de fluorescencia, siempre y cuando el objetivo final de la técnica no sea el diagnóstico diferencial entre especies (Higes y col., 2010b). Al realizar el Test Diagnóstico, la IFI reveló un porcentaje de sensibilidad del 97,79 % con respecto al 100 % de la PCR, tomada como patrón de oro para el análisis comparativo. La especificidad también fue alta, con un 93,18 % (apartado 4.4.2.4.a.; Tabla 4.4.12.).

En lo que respecta a los anticuerpos monoclonales especie-específicos de *N. ceranae* (F1. 7D2 y F4. 1B11), la interpretación y el análisis de los resultados debe tener en cuenta la diferenciación entre especies, ya que se consideran positivas las colmenas infectadas sólo con *N. ceranae* y coinfectadas, y negativas aquellas infectadas únicamente con *N. apis* o libres de infección. En cuanto al porcentaje de positivos y negativos, los resultados obtenidos por ambos anticuerpos monoclonales (apartado 4.4.1.2.; Tabla 4.4.3.) fueron muy similares a los de la PCR múltiple, revelando en el estudio estadístico unos índices de concordancia muy buenos y una correlación significativa con los mismos, aunque con un valor de *Chi* mayor en el caso del F4. 1B11 (apartados 4.4.2.2.a. y b.). La sensibilidad calculada mediante el Test Diagnóstico fue la misma en ambos casos (93,62 %), pero el porcentaje de especificidad obtenido con F4. 1B11 (91,86 %) fue mayor que el de F1. 7D2 (88,37 %) (apartados 4.4.2.4.b.1. y b.2.; Tabla 4.4.13.).

Las diferencias en los porcentajes de positivos y negativos entre la PCR múltiple y la IFI utilizando los distintos anticuerpos monoclonales, deben ser considerados como falsos diagnósticos: falsos negativos cuando no ha detectado el parásito pero la PCR sí lo ha hecho, y falsos positivos cuando ha detectado el parásito y la PCR no lo detecta. Como se mencionó anteriormente (apartado 5.1.), los falsos negativos pueden atribuirse a una menor sensibilidad de la técnica de IFI (Weiss y Vossbrinck, 1999), reflejada estadísticamente en los resultados de los

Test Diagnósticos que han mostrado unos porcentajes de sensibilidad de las IFI ligeramente menores a los de la PCR múltiple. Por otro lado, los falsos positivos podrían ser indicativos de cierta inespecificidad por parte de los AcMc. Sin embargo, los porcentajes de especificidad calculados para la IFI mediante los Test Diagnósticos resultaron muy similares a los de la PCR múltiple. Por tanto, una posible explicación para estas diferencias en los resultados podría ser el hecho de que la PCR no pueda detectar aquellas esporas que hubieran extruido su material genético (Martínez Fernández, 1995), mientras que la IFI las detectaría por su reactividad frente a la exospora.

Una vez evaluada la sensibilidad y especificidad de la técnica de IFI en el diagnóstico diferencial de *N. ceranae* con los AcMc F1. 7D2 y F4. 1B11, se procedió al estudio comparativo con el anticuerpo policlonal (AcPc) obtenido y caracterizado anteriormente en este trabajo. Al probar dicho anticuerpo frente a las 180 muestras de colmenas, éste presentó unos porcentajes de positivos y negativos para la detección de *N. ceranae* similares a los obtenidos con el AcMc F4. 1B11 y más divergentes respecto a los mostrados por F1. 7D2 (apartado 4.4.1.2.; Tabla 4.4.3.). El AcPc presentó una mayor sensibilidad y especificidad que las de ambos AcMc, con unos porcentajes de 94,68 y 95,35 % respectivamente (apartado 4.4.2.4.b.; Tabla 4.4.13.).

En general, los AcPc son más fáciles de producir que los AcMc, y en algunos casos particulares han mostrado una sensibilidad y especificidad superiores a los mismos (Yokoyama, 1995). Sin embargo, al utilizar anticuerpos policlonales la producción del suero obtenido se ve limitada al animal inmunizado, y sus características podrían no ser reproducibles en otro animal, aún utilizando el mismo determinante antigénico en su inmunización. Con el desarrollo de AcMc, aunque el proceso resulta más costoso, se puede disponer del anticuerpo producido de manera permanente, manteniendo indefinidamente la misma especificidad en los distintos lotes y asegurando la reproducibilidad de los ensayos llevados a cabo con los mismos (Goding, 1996).

Finalmente, la IFI llevada a cabo utilizando el AcMc F4. 9G2 (específico de *N. apis*) presentó las mayores diferencias en los porcentajes de positivos y negativos con respecto a los obtenidos por la PCR múltiple (apartado 4.4.1.3.; Tabla 4.4.4). De hecho, al realizar el análisis estadístico, a pesar de que la comparación de proporciones resultó significativa, el análisis de concordancia presentó una valoración moderada (apartado 4.4.2.3.), lo que se tradujo en una sensibilidad y especificidad por parte de este AcMc (64,38 y 87,85 % respectivamente) más bajas que en los casos de F1. 6F10 (97,79 y 93,18 %), F1. 7D2 (93,62 y 88,37 %) y F4. 1B11 (93,62 y 91,86 %) (apartado 4.4.2.4.c.; Tabla 4.4.14.).

Esta mayor discordancia en los resultados con respecto a los de la PCR podría ser debida a la elección de la dilución de uso del AcMc para evitar la reacción cruzada con *N. ceranae*. En este estudio se seleccionó aquella dilución que garantizase el diagnóstico diferencial, con la dificultad de presentar una fluorescencia débil, que pudo influir en el aumento de falsos negativos (apartado 4.3.2.1.; Tabla 4.3.2.).

Las carencias del AcMc F4. 9G2 en el diagnóstico diferencial podrían suplirse con la utilización del anticuerpo de género F1. 6F10 y los específicos F1. 7D2 y F4. 1B11, los cuales han demostrado su utilidad para el diagnóstico de la nosemosis causada por *Nosema* sp. y por *N. ceranae* respectivamente. Así mismo, con el objetivo de utilizar el AcMc F4. 9G2 en el diagnóstico diferencial de *N. apis*, se podrían desarrollar y utilizar preparaciones concentradas del mismo, como por ejemplo las ascitis obtenidas en este trabajo (apartado 3.2.2.4) o los sobrenadantes saturados sometidos a algún proceso de concentración y/o purificación, aunque estos procesos podrían resultar costosos, principalmente en el caso particular de los anticuerpos del isotipo IgM (Andrew y col., 2009). Sin embargo, dado que la nosemosis causada por *N. apis* es de menor patogenicidad para las abejas que la causada por *N. ceranae*, y que además puede ser diagnosticada por sus signos clínicos (OIE, 2008), el AcMc F4. 9G2 podría utilizarse para confirmar la presencia de *N. apis* tras una evaluación clínica de las colmenas, sin la necesidad de someterlo a concentración y purificación.

Al no haberse descrito AcMc frente a ninguna de las especies de *Nosema* que afectan a las abejas, *N. ceranae* y *N. apis*, no podemos comparar los porcentajes de sensibilidad y especificidad obtenidos por nuestros AcMc. Sin embargo, se han realizado estudios similares para determinar la sensibilidad y la especificidad de AcMc frente a otros microsporidios. Cisse y col. (2002) calcularon los porcentajes de sensibilidad y especificidad de unos AcMc obtenidos, y más tarde comercializados, frente a *E. bienewsi* (Acoceberry y col., 1999). Estos AcMc presentaron una concordancia perfecta (100 % de sensibilidad y especificidad) con la PCR, que también tomaron como técnica de referencia. Sin embargo, el tamaño muestral de este experimento fue menor, ya que analizaron un total de 61 muestras frente a las 180 que se han analizado en este trabajo, en el que los AcMc utilizados han presentado porcentajes de sensibilidad y especificidad menores (apartado 4.4.2.4.; Tablas 4.4.12.; 4.4.13. y 4.4.14.).

En último lugar, para analizar la utilidad de las técnicas de IFI desarrolladas en este trabajo, éstas también se compararon con la microscopía óptica (MO) con contraste de fases, técnica que se utiliza en el CAR junto con la PCR múltiple, para el diagnóstico de la nosemosis en las abejas de la miel.

Al comparar los resultados obtenidos por la MO con los de la IFI llevada a cabo con el AcMc F1. 6F10, los porcentajes de positivos y negativos para la detección de *Nosema* sp. obtenidos por las dos técnicas fueron muy similares (apartado 4.4.1.1.; Tabla 4.4.1.). Como se ha mencionado anteriormente, la detección de las esporas de *Nosema* sp. no resulta complicada ya que, al ser muy refringentes, éstas se pueden ver fácilmente utilizando microscopio con contraste de fases (Higes y col., 2010b). Es el diagnóstico diferencial entre las dos especies (*N. ceranae* y *N. apis*) el que resulta bastante complicado incluso para el personal cualificado (Fries, 2010; Higes y col., 2010b), debido a que las mayores diferencias entre ambas se encuentran en su ultraestructura, independientemente de su morfología (Fries, 1989; Fries y col., 1996).

Este hecho quedó patente al estudiar la presencia de *N. ceranae* en particular en las colmenas. En este caso, los porcentajes de muestras positivas y negativas difirieron entre la IFI y la MO (apartado 4.4.1.2.; Tabla 4.4.3.), aunque los resultados de la MO tuvieron una buena concordancia y una correlación significativa con los de la PCR múltiple (apartado 4.1.1.5.; Tabla 4.1.11.), al igual que con los AcMc F1. 7D2 y F4. 1B11 (apartado 4.4.2.2.a. y b.; Tablas 4.4.8. y 4.4.9.). Sin embargo, al analizar el diagnóstico de la MO en cada colmena vemos que esta técnica, aún siendo llevada a cabo por personal experimentado en la identificación de *N. apis* y *N. ceranae*, reveló falsos positivos y/o negativos.

En la Tabla 4.4.2. se pueden observar numerosas colmenas en las que la PCR múltiple detectó ambas especies de parásito, mientras que la MO identificaba sólo una de las ellas, y otros en los que la MO determinaba coinfección cuando la PCR sólo detectó una de las especies (Tabla 4.4.2.). Los falsos positivos y/o negativos en el caso de *N. apis* se podrían considerar de menor importancia, ya que ésta especie produce signos clínicos patentes que ayudarían a su diagnóstico (OIE, 2008), pero en el caso de *N. ceranae*, un diagnóstico erróneo podría evitar un tratamiento rápido, llevando a la pérdida de la colmena en poco tiempo (Higes y col., 2010b), aparte de los errores que acarrearían en el estudio de la epidemiología de esta especie.

Dado que al comparar los resultados obtenidos por F1. 7D2 y F4. 1B11 con los de la MO las tablas de contingencia utilizadas para hacer el Test Diagnóstico tuvieron en cuenta solamente la presencia o ausencia de *N. ceranae* (apartado 4.1.1.5.; Tabla 4.1.9. y apartado 4.4.2.2. Tablas 4.4.8. y 4.4.9.), muchos de estos falsos positivos y/o negativos no tuvieron incidencia en el análisis estadístico, y por eso las especificidades de las IFI que utilizan esos dos anticuerpos (específicos de *N. ceranae*) y la MO resultaron tan similares, no así las sensibilidades, que fueron superiores para los AcMc (apartado 4.4.2.4.b.; Tabla 4.4.13).

Por último, al detectar la presencia o ausencia de *N. apis* en las muestras estudiadas mediante la técnica de IFI con el AcMc F4. 9G2, se obtuvieron unos porcentajes de colmenas positivas y negativas muy diferentes a los revelados por la MO (apartado 4.4.1.3.; Tabla 4.4.4.). Los resultados mostrados por ésta última presentaron una correlación de mayor significancia y una mejor concordancia con respecto a los de la PCR múltiple que aquellos obtenidos con el AcMc (apartado 4.4.2.3.). De hecho, la prueba de Test diagnóstico describió unos porcentajes de sensibilidad para la MO (94,52 %) superiores a los del AcMc (64,38 %). No obstante, la especificidad de ésta (80,37 %) fue menor que la mostrada por F4. 9G2 (87,85 %) (apartado 4.4.2.4.c.; Tabla 4.4.14.).

Como se ha mencionado anteriormente, la dilución de uso del AcMc F4. 9G2 podría justificar la baja sensibilidad presentada por el mismo. Al seleccionar una dilución alta para evitar el reconocimiento inespecífico, la baja señal de detección dificultaría el diagnóstico. Así mismo, el hecho de presentar una mayor especificidad que la MO podría deberse a los errores que se han descrito para esta última en la identificación diferencial entre *N. ceranae* y *N. apis*.

Los resultados obtenidos con los AcMc desarrollados en el presente trabajo confirman la IFI como una alternativa a la microscopía óptica para la detección de *N. ceranae* en colmenas de abejas. La MO es una técnica de menor sensibilidad y especificidad, y requiere un mayor grado de especialización. De igual modo, la IFI con los AcMc presenta una sensibilidad y especificidad semejantes a las de la PCR múltiple, por lo que puede resultar de utilidad, especialmente en aquellos laboratorios en los que la técnica molecular no resulte de fácil acceso. También puede utilizarse en combinación con la PCR múltiple para una mejor detección e identificación de las distintas especies de parásito (Fries *et al.*, 1996).

## 6. CONCLUSIONES.

1. El sistema de IFI desarrollado utilizando los anticuerpos policlonales frente a *Nosema ceranae* ha presentado una sensibilidad y especificidad mayores a las observadas con la microscopía óptica y una correlación muy buena con la técnica de PCR múltiple, tomada como técnica de referencia.
2. El sistema de IFI desarrollado utilizando el anticuerpo monoclonal F1. 6F10 frente a *Nosema* spp. y los anticuerpos monoclonales F1.7D2 y F4. 1B11 frente a *N. ceranae* ha presentado una correlación muy buena con la PCR, tomada como referencia.
3. Los anticuerpos policlonales y monoclonales obtenidos en este trabajo se muestran como buenos candidatos para su uso en el diagnóstico diferencial mediante IFI de la nosemosis causada por *N. ceranae*, ya que permiten realizar una identificación al nivel de especie.
4. Se propone el sistema desarrollado como una alternativa para el diagnóstico de rutina de la nosemosis causada por *N. ceranae*, ya que presenta elevada sensibilidad y especificidad, y una mayor accesibilidad en los laboratorios.



## 9. BIBLIOGRAFÍA.

- Abou El Naga, I. F., Gaafar, M. R., El-Zawawy, L. A., El-Said, D. and Mossallam, S. F.** (2008). The utility of direct agglutination (DAT) and fast agglutination screening test (FAST) in serodiagnosis of experimental microsporidiosis. *Journal of Egyptian Society of Parasitology* 38(3), 903-918.
- Accoceberry, I., Thellier, M., Desportes-Livage, I., Achbarou, A., Biligui, S., Danis, M. and Datry, A.** (1999). Production of monoclonal antibodies directed against the microsporidium *Enterocytozoon bieneusi*. *Journal of Clinical Microbiology* 37(12), 4107-4112.
- Accoceberry, I., Thellier, M., Datry, A., Desportes-Livage, I., Biligui, S., Danis, M., Santarelli, X.** (2001). One-step purification of *Enterocytozoon bieneusi* spores from human stools by immunoaffinity expanded-bed adsorption. *Journal of Clinical Microbiology* 39(5), 1947-1951.
- Achbarou, A., Thellier, M., Accoceberry, I., Prigneau, O., Bouladoux, N., Datry, A., Mazier, D. and Desportes-Livage, I.** (1999). Production of immunological probes raised against *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon intestinalis*, two microsporidian species causing intestinal infections in man. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 46(s5), 32S-33S.
- Adl, S. M., Simpson, A. G., Farmer, M. A., Andersen, R. A., Anderson, O. R., Barta, J. R., Bowser, S. S., Brugerolle, G., Fensome, R. A., Fredericq, S., et al.** (2005a). The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 52(5), 399-451.
- Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Farmer, M. A., Andersen, R. A., Anderson, O. R., Barta, J. R., Bowser, S. S., Brugerolle, G. U. Y., Fensome, R. A., Fredericq, S., et al.** (2005b). The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 52(5), 399-451.
- Alaux, C., Brunet, J. L., Dussaubat, C., Mondet, F., Tchamitchan, S., Cousin, M., Brillard, J., Baldy, A., Belzunces, L. P. and Le Conte, Y.** (2010). Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology* 12(3), 774-782.
- Alaux, C., Folschweiller, M., McDonnell, C., Beslay, D., Cousin, M., Dussaubat, C., Brunet, J. L. and Le Conte, Y.** (2011). Pathological effects of the microsporidium *Nosema ceranae* on honey bee queen physiology (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology* 106(3), 380-385.
- Aldras, A. M., Orenstein, J. M., Kotler, D. P., Shaddock, J. A. and Didier, E. S.** (1994). Detection of microsporidia by indirect immunofluorescence antibody test using polyclonal and monoclonal antibodies. *Journal of Clinical Microbiology* 32(3), 608-612.
- Aliferis, K. A., Copley, T. and Jabaji, S.** (2012). Gas chromatography-mass spectrometry metabolite profiling of worker honey bee (*Apis mellifera* L.) hemolymph for the study of *Nosema ceranae* infection. *Journal of Insect Physiology* 58(10):1349-1359.
- Altman, D. G.** (1991). *Practical statistics for medical research*. Chapman and Hall (New York).
- Amigo, J. M., Gracia, M. P., Comas, J., Salvado, H. and Vivares, C. P.** (1994). Comparative study of microsporidian spores by flow cytometric analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 41(3), 210-214.
- Anderson, D. and East, I. J.** (2008). The latest buzz about colony collapse disorder. *Science* 319(5864), 724-725.
- Andersson, J. and Melchers, F.** (1978). The antibody repertoire of hybrid cell lines obtained by fusion of X63-AG8 myeloma cells with mitogen-activated B-cell blasts. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 81, 130-139.
- Andrew, S. M., Titus, J. A., Amin, A. and Coico, R.** (2009). Isolation of murine and human immunoglobulin M and murine immunoglobulin D. In *Current Protocols in Immunology*. John Wiley and Sons, Inc. (New York).
- Antunez, K., Anido, M., Garrido-Bailon, E., Botias, C., Zunino, P., Martinez-Salvador, A., Martin-Hernandez, R. and Higes, M.** (2012). Low prevalence of honeybee viruses in Spain during 2006 and 2007. *Research in Veterinary Science* 93(3):1441-1445.
- Antunez, K., Martin-Hernandez, R., Prieto, L., Meana, A., Zunino, P. and Higes, M.** (2009). Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environmental Microbiology* 11(9), 2284-2290.



- Ares, A. M., Nozal, M. J., Bernal, J. L., Martín-Hernandez, R., Higes, M. and Bernal, J.** (2012). Liquid chromatography coupled to ion trap-tandem mass spectrometry to evaluate juvenile hormone III levels in bee hemolymph from *Nosema* spp. infected colonies. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 899, 146-153.
- Aronstein, K. A.** (2010). Detect *Nosema* parasite in time to save bee colonies. *American Bee Journal* 150(1), 63-65.
- Aronstein, K. A., Saldivar, E. and Webster, T. C.** (2011). Evaluation of *Nosema ceranae* spore-specific polyclonal antibodies. *Journal of Apicultural Research* 50(2), 145-151.
- Aronstein, K. A., Webster, T. C. and Saldivar, E.** (2013). A serological method for detection of *Nosema ceranae*. *Journal of Applied Microbiology* 114(3), 621-625.
- Bailey, L.** (1981). *Honey bee pathology*. Second Edition. Academic Press (London).
- Balbani, M.** (1882). Sur les microsporidies ou psorospermies des articles. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* 95, 1168-1171.
- Beckers, P. J., Derks, G. J., Gool, T., Rietveld, F. J. and Sauerwein, R. W.** (1996). *Encephalocytozoon intestinalis*-specific monoclonal antibodies for laboratory diagnosis of microsporidiosis. *Journal of Clinical Microbiology* 34(2), 282-285.
- Bernal, J., Garrido-Bailon, E., del Nozal, M. J., González-Porto, A. V., Martín-Hernandez, R., Diego, J. C., Jiménez, J. J., Bernal, J. L. and Higes, M.** (2010). Overview of pesticide residues in stored pollen and their potential effect on bee colony (*Apis mellifera*) losses in Spain. *Journal of Economic Entomology* 103(6), 1964-1971.
- Bernal, J., Martín-Hernandez, R., Diego, J. C., Nozal, M. J., Gozalez-Porto, A. V., Bernal, J. L. and Higes, M.** (2011). An exposure study to assess the potential impact of fipronil in treated sunflower seeds on honey bee colony losses in Spain. *Pest Management Science* 67(10), 1320-1331.
- Blow, A. M., Botham, G. M., Fisher, D., Goodall, A. H., Tilcock, C. P. and Lucy, J. A.** (1978). Water and calcium ions in cell fusion induced by poly(ethylene glycol). *FEBS Letters* 94(2), 305-310.
- Bohne, W., Ferguson, D. J., Kohler, K. and Gross, U.** (2000). Developmental expression of a tandemly repeated, glycine- and serine-rich spore wall protein in the microsporidian pathogen *Encephalitozoon cuniculi*. *Infection and Immunity* 68(4), 2268-2275.
- Booy, A., Haddow, J. D. and Olafson, R. W.** (2005). Isolation of the salmonid rhamnose-binding lectin STL2 from spores of the microsporidian fish parasite *Loma salmonae*. *Journal of Fish Diseases* 28(8), 455-462.
- Bornay-Llinares, F. J., da Silva, A. J., Moura, H., Schwartz, D. A., Visvesvara, G. S., Pieniazek, N. J., Cruz-Lopez, A., Hernandez-Jauregui, P., Guerrero, J. and Enriquez, F. J.** (1998). Immunologic, microscopic, and molecular evidence of *Encephalitozoon intestinalis* (*Septata intestinalis*) infection in mammals other than humans. *Journal of Infectious Diseases* 178(3), 820-826.
- Botias, C., Martín-Hernández, R., Garrido-Bailon, E., González-Porto, A., Martínez-Salvador, A., De La Rúa, P., Meana, A. and Higes, M.** (2012). The growing prevalence of *Nosema ceranae* in honey bees in Spain, an emerging problem for the last decade. *Research in Veterinary Science* 93(1), 150-155.
- Bouladoux, N., Biligui, S. and Desportes-Livage, I.** (2003). A new monoclonal antibody enzyme-linked immunosorbent assay to measure in vitro multiplication of the microsporidium *Encephalitozoon intestinalis*. *Journal of Microbiological Methods* 53(3), 377-385.
- Bourgeois, A. L., Rinderer, T. E., Beaman, L. D. and Danka, R. G.** (2010). Genetic detection and quantification of *Nosema apis* and *N. ceranae* in the honey bee. *Journal of Invertebrate Pathology* 103(1), 53-58.
- Bourgeois, L., Beaman, L., Holloway, B. and Rinderer, T. E.** (2012). External and internal detection of *Nosema ceranae* on honey bees using real-time PCR. *Journal of Invertebrate Pathology* 109(3), 323-325.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Breguetova, N. G.** (1953). The mite fauna of the Far East. *Parasitologicheskii Zbomik ZIN AN SSR*. 15, 222-223.
- Brekke, O. H. and Sandlie, I.** (2003). Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century. *Nature Reviews Drug Discovery* 2(1), 52-62.

- Bromenshenk, J. J., Henderson, C. B., Wick, C. H., Stanford, M. F., Zulich, A. W., Jabbour, R. E., Deshpande, S. V., McCubbin, P. E., Seccomb, R. A., Welch, P. M., et al.** (2010). Iridovirus and microsporidian linked to honey bee colony decline. *PLoS One* 5(10): e13181.
- Brosson, D., Kuhn, L., Prensier, G., Vivares, C. P. and Texier, C.** (2005). The putative chitin deacetylase of *Encephalitozoon cuniculi*: a surface protein implicated in microsporidian spore-wall formation. *FEMS Microbiology Letters* 247(1), 81-90.
- Brosson, D., Kuhn, L., Delbac, F., Garin, J., C, P. V. and Texier, C.** (2006). Proteomic analysis of the eukaryotic parasite *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporidia): a reference map for proteins expressed in late sporogonial stages. *Proteomics* 6(12), 3625-3635.
- Calderón, R. A., Sánchez, L. A., Yáñez, O. and Fallas, N.** (2008). Presence of *Nosema ceranae* in Africanized honey bee colonies in Costa Rica. *Journal of Apicultural Research* 47(4), 328-329.
- Cali, A., Kotler, D. P. and Orenstein, J. M.** (1993). *Septata intestinalis* n.g., n. sp. an intestinal microsporidian associated with chronic diarrhea and dissemination in AIDS patients. *Journal of Protozoology* 40(1), 101-112.
- Cali, A. and Takvorian, P. M.** (1999). Developmental morphology and life cycles of the microsporidia. In *The microsporidia and microsporidiosis*. ASM Press (Washington).
- Cali, A., Takvorian, P. M., Lewin, S., Rendel, M., Sian, C. S., Wittner, N. W., Tanowitz, H. B., Keohane, E. and Weiss, L. M.** (1998). *Brachiola vesicularum*, n.g., n. sp. a new microsporidium associated with AIDS and myositis. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 45(3), 240-251.
- Canning, E. U.** (1988). Nuclear division and chromosome cycle in microsporidia. *Biosystems* 21(3-4), 333-340.
- Canning, E. U.** (1993). *Microsporidia*. In *Parasitic Protozoa*. Academic Press (New York).
- Canning, E. U. and Lom, J.** (1986). *The microsporidia of vertebrates*. Academic Press (New York).
- Canning, E. U. and Hollister, W. S.** (1987). Microsporidia of mammals--widespread pathogens or opportunistic curiosities?. *Parasitology Today* 3(9), 267-273.
- Cantwell, G. E.** (1970). Standard methods for counting *Nosema* spores. *American Bee Journal* 110(6), 222-223.
- Cebrián, M.** (1985). *Anticuerpos monoclonales: Su obtención y futuro experimental*. Tesina de Licenciatura Departamento de Fisiología Animal. U.C.M.
- Cisse, O.A., Ouattara, A., Thellier, M., Accoceberry, I., Biligui, S., Minta, D., Doumbo, O., Desportes-Livage, I., Thera, M. A., Danis, M. and Datry A.** (2002). Evaluation of an immunofluorescent-antibody test using monoclonal antibodies directed against *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon intestinalis* for diagnosis of intestinal microsporidiosis in Bamako (Mali). *Journal of Clinical Microbiology* 40(5), 1715-1718.
- CMPMA** Comité on Methods of Producing Monoclonal Antibodies. Institute for Laboratory Animal Research, National Research Council. (1999). *Monoclonal antibody production*. National Academy Press (Washington).
- COLOSS** Prevention of honey bee COlony LOSSes (2009). Conclusions Proc. Workshop *Nosema* disease: lack of knowledge and work standardization (COST Action FA0803) [en línea]. Disponible en: <http://www.coloss.org/publications/Nosema-Workshop-Proceedings.pdf> [Consultado el 23 de enero de 2014].
- Colvin, R. B. and Preffer, F. I.** (1991). Laboratory monitoring of therapy with OKT3 and other murine monoclonal antibodies. *Clinics in Laboratory Medicine* 11(3), 693-714.
- Coll Morales, J.** (1982). Anticuerpos monoclonales y su uso en diagnóstico. *Immunologica* 6, 47-82.
- Cooper, H. M. and Paterson, Y.** (1995). Production of Polyclonal Antisera. In *Current Protocols in Immunology*. John Wiley and Sons, Inc. (New York).
- Copley, T. R. and Jabaji, S. H.** (2012). Honeybee glands as possible infection reservoirs of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in naturally infected forager bees. *Journal of Applied Microbiology* 112(1), 15-24.
- Core, A., Runckel, C., Ivers, J., Quock, C., Siapno, T., Denault, S., Brown, B., Derisi, J., Smith, C. D. and Hafernik, J.** (2012). A new threat to honey bees, the parasitic phorid fly *Apocephalus borealis*. *PLoS One* 7(1): e29639.
- Cornman, R. S., Chen, Y. P., Schatz, M. C., Street, C., Zhao, Y., Desany, B., Egholm, M., Hutchison, S., Pettis, J. S., Lipkin, W. I. and Evans, J. D.** (2009). Genomic analyses of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of honey bees. *PLoS Pathogens* 5(6): e1000466.

- Corradi, N., Pombert, J. F., Farinelli, L., Didier, E. S. and Keeling, P. J.** (2010). The complete sequence of the smallest known nuclear genome from the microsporidian *Encephalitozoon intestinalis*. *Nature Communications* 1: 77.
- Costa, C., Tanner, G., Lodesani, M., Maistrello, L. and Neumann, P.** (2011). Negative correlation between *Nosema ceranae* spore loads and deformed wing virus infection levels in adult honey bee workers. *Journal of Invertebrate Pathology* 108(3), 224-225.
- Cox-Foster, D. L., Conlan, S., Holmes, E. C., Palacios, G., Evans, J. D., Moran, N. A., Quan, P. L., Briese, T., Hornig, M., Geiser, D. M., et al.** (2007). A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* 318(5848), 283-287.
- Cox, K. M., Sterling, J. D., Regan, J. T., Gasdaska, J. R., Frantz, K. K., Peele, C. G., Black, A., Passmore, D., Moldovan-Loomis, C., Srinivasan, M., et al.** (2006). Glycan optimization of a human monoclonal antibody in the aquatic plant *Lemna minor*. *Nature Biotechnology* 24(12), 1591-1597.
- Croppo, G. P., Leitch, G. J., Wallace, S. and Visvesvara, G. S.** (1994). Immunofluorescence and western blot analysis of microsporidia using anti-*Encephalitozoon hellem* immunoglobulin G monoclonal antibodies. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 41(s5), 31S.
- Croppo, G. P., Visvesvara, G. S., Leitch, G. J., Wallace, S. and De Groote, M. A.** (1997). Western blot and immunofluorescence analysis of a human isolate of *Encephalitozoon cuniculi* established in culture from the urine of a patient with AIDS. *International Journal for Parasitology* 83(1), 66-69.
- Croppo, G. P., Visvesvara, G. S., Leitch, G. J., Wallace, S. and Schwartz, D. A.** (1998). Identification of the microsporidian *Encephalitozoon hellem* using immunoglobulin G monoclonal antibodies. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 122(2), 182-186.
- Curgy, J. J., Vavra, J. and Vivares, C.** (1980). Presence of ribosomal RNAs with prokaryotic properties in *Microsporidia*, eukaryotic organisms. *Biology of the Cell* 38, 49-51.
- Curry, A.** (2003). Electron microscopy and the investigation of new infectious diseases. *International Journal of Infectious Diseases* 7(4), 251-257.
- Chaimanee, V., Warrit, N. and Chantawannakul, P.** (2010). Infections of *Nosema ceranae* in four different honeybee species. *Journal of Invertebrate Pathology* 105(2), 207-210.
- Chaimanee, V., Chen, Y., Pettis, J. S., Scott Cornman, R. and Chantawannakul, P.** (2011). Phylogenetic analysis of *Nosema ceranae* isolated from European and Asian honeybees in Northern Thailand. *Journal of Invertebrate Pathology* 107(3), 229-233.
- Chaimanee, V., Chantawannakul, P., Chen, Y., Evans, J. D. and Pettis, J. S.** (2012). Differential expression of immune genes of adult honey bee (*Apis mellifera*) after inoculated by *Nosema ceranae*. *Journal of Insect Physiology* 58(8), 1090-1095.
- Challier, S., Brown, S., Ombrouck, C., Desportes-Livage, I., De Nay, D. and Gentilini, M.** (1994). Flow cytometry as a possible method of isolation of spores of the microsporidian *Enterocytozoon bieneusi*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 41(s5), 27S.
- Chen, Y., Evans, J. D., Smith, I. B. and Pettis, J. S.** (2008). *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *Journal of Invertebrate Pathology* 97(2), 186-188.
- Chen, Y., Evans, J. D., Zhou, L., Boncristiani, H., Kimura, K., Xiao, T., Litkowski, A. M. and Pettis, J. S.** (2009a). Asymmetrical coexistence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology* 101(3), 204-209.
- Chen, Y. P., Evans, J. D., Murphy, C., Gutell, R., Zuker, M., Gundensen-Rindal, D. and Pettis, J. S.** (2009b). Morphological, Molecular, and Phylogenetic Characterization of *Nosema ceranae*, a Microsporidian Parasite Isolated from the European Honey Bee, *Apis mellifera*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 56(2), 142-147.
- Choy, W. N., Gopalakrishnam, T. V. and Littlefield, J. W.** (1982). Techniques for using HAT selection in somatic cell genetics. In *Techniques in Somatic Cell Genetics*. Plenum Press (New York).
- Dainat, B., Evans, J. D., Chen, Y. P., Gauthier, L. and Neumann, P.** (2012a). Dead or alive: deformed wing virus and *Varroa destructor* reduce the life span of winter honeybees. *Applied and Environmental Microbiology* 78(4), 981-987.
- Dainat, B., Evans, J. D., Chen, Y. P., Gauthier, L. and Neumann, P.** (2012b). Predictive markers of honey bee colony collapse. *PLoS One* 7(2): e32151.

- De Groote, M. A., Visvesvara, G., Wilson, M. L., Pieniazek, N. J., Slemenda, S. B., daSilva, A. J., Leitch, G. J., Bryan, R. T. and Reves, R.** (1995). Polymerase chain reaction and culture confirmation of disseminated *Encephalitozoon cuniculi* in a patient with AIDS: successful therapy with albendazole. *Journal of Infectious Diseases* 171(5), 1375-1378.
- del Aguila, C., Lopez-Velez, R., Fenoy, S., Turrientes, C., Cobo, J., Navajas, R., Visvesvara, G. S., Croppo, G. P., Da Silva, A. J. and Pieniazek, N. J.** (1997a). Identification of *Enterocytozoon bieneusi* spores in respiratory samples from an AIDS patient with a 2-year history of intestinal microsporidiosis. *Journal of Clinical Microbiology* 35(7), 1862-1866.
- del Aguila, C., Navajas, R., Gurbindo, D., Ramos, J. T., Mellado, M. J., Fenoy, S., Muñoz Fernandez, M. A., Subirats, M., Ruiz, J., and Pieniazek, N. J.** (1997b). Microsporidiosis in HIV-positive children in Madrid (Spain). *Journal of Eukaryotic Microbiology* 4 (s6), 84S-85S.
- del Aguila, C., Croppo, G. P., Moura, H., da Silva, A. J., Leitch, G. J., Moss, D. M., Wallace, S., Slemenda, S. B., Pieniazek, N. J. and Visvesvara, G. S.** (1998). Ultrastructure, immunofluorescence, Western blot, and PCR analysis of eight isolates of *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* established in culture from sputum and urine samples and duodenal aspirates of five patients with AIDS. *Journal of Clinical Microbiology* 36(5), 1201-1208.
- del Aguila, C., Moura, H., Fenoy, S., Navajas, R., Lopez-Velez, R., Li, L., Xiao, L., Leitch, G. J., da Silva, A., Pieniazek, N. J., et al.** (2001a). In vitro culture, ultrastructure, antigenic, and molecular characterization of *Encephalitozoon cuniculi* isolated from urine and sputum samples from a Spanish patient with AIDS. *Journal of Clinical Microbiology* 39(3), 1105-1108.
- del Águila, C., Rueda, C., Cámara, C. and Fenoy, S.** (2001b). Seroprevalence of anti-*Encephalitozoon* antibodies in spanish immunocompetent subjects. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 48(s1), 75S-78S.
- del Aguila, C., Izquierdo, F., Granja, A. G., Hurtado, C., Fenoy, S., Fresno, M. and Revilla, Y.** (2006). *Encephalitozoon* microsporidia modulates p53-mediated apoptosis in infected cells. *International Journal for Parasitology* 36(8), 869-876.
- del Aguila, C., Soriano, V., Navajas, R., Subirats, M., Fenoy, S., Valencia, E., Baquero, M. and Pieniazek, N. J.** (1997c). Species identification of intestinal microsporidiosis in HIV-positive patients using the polymerase chain reaction. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 15(9), 456-461.
- Delbac, F., Duffieux, F., David, D., Metenier, G. and Vivares, C. P.** (1998). Immunocytochemical identification of spore proteins in two microsporidia, with emphasis on extrusion apparatus. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 45(2), 224-231.
- Desportes, I., Le Charpentier, Y., Galian, A., Bernard, F., Cochand-Priollet, B., Lavergne, A., Ravisse, P. and Modigliani, R.** (1985). Occurrence of a new microsporidian: *Enterocytozoon bieneusi* n.g., n. sp. in the enterocytes of human patient with AIDS. *Journal of Protozoology* 32(2), 250-254.
- Didier, E. S., Didier, P. J., Friedberg, D. N., Stenson, S. M., Orenstein, J. M., Yee, R. W., Tio, F. O., Davis, R. M., Vossbrinck, C., Millichamp, N., et al.** (1991). Isolation and characterization of a new human microsporidian, *Encephalitozoon hellem* (n. sp.), from three AIDS patients with keratoconjunctivitis. *Journal of Infectious Diseases* 163(3), 617-621.
- Didier, E. S., Orenstein, J. M., Aldras, A., Bertucci, D., Rogers, L. B. and Janney, F. A.** (1995). Comparison of three staining methods for detecting microsporidia in fluids. *Journal of Clinical Microbiology* 33(12), 3138-3145.
- Didier, E. S. and Weiss, L. M.** (2006). Microsporidiosis: current status. *Current Opinion in Infectious Diseases* 19(5), 485-492.
- Dolgikh, V. V. and Semenov, P. B.** (2003). The spore wall and polar tube proteins of the microsporidian *Nosema grylli*: the major spore wall protein is released before spore extrusion. *Tsitologiya* 45(3), 324-329.
- Dussaubat, C., Brunet, J. L., Higes, M., Colbourne, J. K., Lopez, J., Choi, J. H., Martín-Hernandez, R., Botias, C., Cousin, M., McDonnell, C., et al.** (2012). Gut pathology and responses to the microsporidium *Nosema ceranae* in the honey bee *Apis mellifera*. *PLoS One* 7(5): e37017.
- Edlind, T., Katiyar, S., Visvesvara, G. and Li, J.** (1996). Evolutionary origins of Microsporidia and basis for benzimidazole sensitivity: an update. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 43(s5), 109S.
- Enriquez, F. J., Ditrach, O., Palting, J. D. and Smith, K.** (1997). Simple diagnosis of *Encephalitozoon* sp. microsporidial infections by using a panspecific antiexospore monoclonal antibody. *Journal of Clinical Microbiology* 35(3), 724-729.
- Enriquez, F. J., Taren, D., Cruz-Lopez, A., Muramoto, M., Palting, J. D. and Cruz, P.** (1998). Prevalence of intestinal encephalitozoonosis in Mexico. *Clinical Infectious Diseases* 26(5), 1227-1229.

- Erler, S., Lommatzsch, S. and Lattorff, H. M.** (2012). Comparative analysis of detection limits and specificity of molecular diagnostic markers for three pathogens (*Microsporidia*, *Nosema* spp.) in the key pollinators *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. *Parasitology Research* 110(4), 1403-1410.
- FAO** Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2008). A contribution to the international initiative for the conservation and sustainable use of pollinators: rapid assessment of pollinators [en línea]. Disponible en: [http://www.bfn.de/fileadmin/MDB/images/themen/bestaeuber/rapid\\_assessment\\_pollinators\\_status.pdf](http://www.bfn.de/fileadmin/MDB/images/themen/bestaeuber/rapid_assessment_pollinators_status.pdf) [Consultado el 23 de enero de 2014].
- Faucon, J. P.** (2005). La nosémose. *La santé de l'Abeille* 209, 343-367.
- Fazekas, S., and Groth, d. S.** (1980). Monoclonal antibodies and how to make them. *Transplantation Proceedings* 12(3), 447-450.
- Fedorko, D. P., Nelson, N. A. and Cartwright, C. P.** (1995). Identification of microsporidia in stool specimens by using PCR and restriction endonucleases. *Journal of Clinical Microbiology* 33(7), 1739-1741.
- Fernandez, J. M., Puerta, F., Cousinou, M., Dios-Palomares, R., Campano, F. and Redondo, L.** (2012). Asymptomatic presence of *Nosema* spp. in Spanish commercial apiaries. *Journal of Invertebrate Pathology* 111(2), 106-110.
- Forsgren, E. and Fries, I.** (2010). Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. *Veterinary Parasitology* 170(3-4), 212-217.
- Fox, J. L.** (2006). Turning plants into protein factories. *Nature Biotechnology* 24(10), 1191-1193.
- Franzen, C. and Muller, A.** (1999). Molecular techniques for detection, species differentiation, and phylogenetic analysis of microsporidia. *Clinical Microbiology Reviews* 12(2), 243-285.
- Franzen, C., Muller, A., Hartmann, P. and Salzberger, B.** (2004). Quantitation of microsporidia in cultured cells by flow cytometry. *Cytometry Part A* 60(1), 107-114.
- Fries, I.** (1988a). Comb replacement and nosema disease (*Nosema apis* Z.) in honey bee colonies. *Apidologie* 19(4), 343-354.
- Fries, I.** (1988b). Infectivity and multiplication of *Nosema apis* Z. in the ventriculus of the honey bee. *Apidologie* 19(3), 319-328.
- Fries, I.** (1989). Observations on the development and transmission of *Nosema apis* Z. in the ventriculus of honey bees. *Journal of Apicultural Research* 28(2), 107-117.
- Fries, I.** (1993). *Nosema apis* - a parasite in the honey bee colony. *Bee World* 74(1), 5-19.
- Fries, I.** (1997). Protozoa. In *Honey bee Pests, Predators and Diseases*. A.I. Root Company (Medina).
- Fries, I.** (2010). *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology* 103(s1), 73S-79S.
- Fries, I. and Feng, F.** (1995). Crossinfectivity of *Nosema apis* in *Apis mellifera* and *Apis cerana*. In *Proceedings of the Apimondia 34th International Apicultural Congress* (pp. 151-155). Bucharest, Romania.
- Fries, I., Feng, F., da Silva, A., Slemenda, S. B. and Pieniazek, N. J.** (1996). *Nosema ceranae* n. sp. (*Microspora*, *Nosematidae*), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *European Journal of Protistology* 32(3), 656-365.
- Fries, I., Lindstrom, A. and Korpela, S.** (2006). Vertical transmission of American foulbrood (*Paenibacillus larvae*) in honey bees (*Apis mellifera*). *Veterinary Microbiology* 114(3-4), 269-274.
- Furuya, K., Miwa, S., Omura, M., Asakura, T., Yamano, K., Takatori, K. and Kudo, S.** (2008a). Mouse monoclonal immunoglobulin E antibodies specific for the microsporidian *Encephalitozoon cuniculi* polar tube protein 1. *Hybridoma (Larchmt)* 27(3), 153-157.
- Furuya, K., Omura, M., Kudo, S., Sugiura, W. and Azuma, H.** (2008b). Recognition profiles of microsporidian *Encephalitozoon cuniculi* polar tube protein 1 with human immunoglobulin M antibodies. *Parasite Immunology* 30(1), 13-21.
- Galfre, G., and Milstein, C.** (1981). Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. *Methods in Enzymology* 73(Pt B), 3-46.

- Galvan, A. L., Sánchez, A. M., Valentín, M. A., Henriques-Gil, N., Izquierdo, F., Fenoy, S. and del Aguila, C.** (2011). First cases of microsporidiosis in transplant recipients in Spain and review of the literature. *Journal of Clinical Microbiology* 49(4), 1301-1306.
- García-Palencia, P., Martín-Hernández, R., González-Porto, A. V., Marín, P., Meana, A. and Higes, M.** (2010). Natural infection by *Nosema ceranae* causes similar lesions as in experimentally infected caged-worker honey bees. *Journal of Apicultural Research* 49(3), 278-283.
- García, L. S.** (2002). Laboratory identification of the microsporidia. *Journal of Clinical Microbiology* 40(6), 1892-1901.
- Garrido-Bailón, E., Martín-Hernández, R., Bernal, J. L., Martínez -Salvador, A., Barrios, L., Meana, A. and Higes, M.** (2010). Short communication. The detection of Israeli Acute Paralysis virus (IAPV), fipronil and imidacloprid in professional apiaries are not related with massive honey bee colony loss in Spain. *Spanish Journal of Agricultural Research* 8(3), 658-661.
- Ghosh, K. and Weiss, L. M.** (2009). Molecular diagnostic tests for microsporidia. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases* 2009: 926521.
- Ghosh, K., Nieves, E., Keeling, P., Pombert, J. F., Henrich, P. P., Cali, A. and Weiss, L. M.** (2011). Branching network of proteinaceous filaments within the parasitophorous vacuole of *Encephalitozoon cuniculi* and *Encephalitozoon hellem*. *Infection and Immunity* 79(3), 1374-1385.
- Ghosh, K., Nieves, E., Keeling, P., Cali, A. and Weiss, L. M.** (2012). A new vesicular compartment in *Encephalitozoon cuniculi*. *Microbes and Infection* 14(4), 324-328.
- Giersch, T., Berg, T., Galea, F., Hornitzky, M., Whitaker, J., Szalanski, A. L. and Kence, M.** (2009). *Nosema ceranae* infects honey bees (*Apis mellifera*) and contaminates honey in Australia. *Apidologie* 40(2), 117-123.
- Gisder, S., Hedtke, K., Mockel, N., Frielitz, M. C., Linde, A. and Genersch, E.** (2010a). Five-year cohort study of *Nosema* spp. in Germany: does climate shape virulence and assertiveness of *Nosema ceranae*? *Applied and Environmental Microbiology* 76(9), 3032-3038.
- Gisder, S., Mockel, N., Linde, A. and Genersch, E.** (2010b). A cell culture model for *Nosema ceranae* and *Nosema apis* allows new insights into the life cycle of these important honey bee-pathogenic microsporidia. *Environmental Microbiology* 68(12): 6446-6450.
- Goding, J. W.** (1980). Antibody production by hybridomas. *Journal of Immunological Methods* 39(4), 285-308.
- Goding, J. W.** (1996). *Monoclonal antibodies: principles and practice*. Academic Press (London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto).
- Gool, T., Vetter, J. C. M., Weinmayr, B., Dam, A. V., Derouin, F. and Dankert, J.** (1997). High seroprevalence of *Encephalitozoon* species in immunocompetent subjects. *Journal of Infectious Diseases* 175(4), 1020-1024.
- Gray, F. H., Cali, A. and Briggs, J. D.** (1969). Intracellular stages in the life cycle of the microsporidian *Nosema apis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 14(3), 391-394.
- Guzman-Novoa, E., Hamiduzzaman, M. M., Arechavaleta-Velasco, M. E., Koleoglu, G., Valizadeh, P. and Corre-Benitez, A.** (2011). *Nosema ceranae* has parasitized Africanized honey bees in Mexico since at least 2004. *Journal of Apicultural Research* 50(2), 167-169.
- Hames, B. D.** (1986). An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis. In *Gel electrophoresis in proteins*. IRL Press (Oxford).
- Hamiduzzaman, M. M., Guzman-Novoa, E. and Goodwin, P. H.** (2010). A multiplex PCR assay to diagnose and quantify *Nosema* infections in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology* 105(2), 151-155.
- Hassanein, M. H.** (1953). The influence of infection by *Nosema apis* on the activities and longevity of the worker honey bee. *Annals of Applied Biology* 40(2), 418-423.
- Hatjina, F., Tsoktouridis, G., Bouga, M., Charistos, L., Evangelou, V., Avtzi, D., Meeus, I., Brunain, M., Smagghe, G. and de Graaf, D. C.** (2011). Polar tube protein gene diversity among *Nosema ceranae* strains derived from a Greek honey bee health study. *Journal of Invertebrate Pathology* 108(2), 131-134.
- Hayman, J. R., Hayes, S. F., Amon, J. and Nash, T. E.** (2001). Developmental expression of two spore wall proteins during maturation of the microsporidian *Encephalitozoon intestinalis*. *Infection and Immunity* 69(11), 7057-7066.

- Hengartner, H., Luzzati, A. L. and Schreier, M.** (1978). Fusion of in vitro immunized lymphoid cells with X63Ag8. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 81, 92-99.
- Hicheri, L. K.** (1978). *Varroa jacobsoni* in Africa. *Apiacta* 13, 178.
- Higes, M., Martín, R., Sanz, A., Álvarez, N., Sanz, A., García-Palencia, P. and Meana, A.** (2005). El síndrome de despoblamiento de las colmenas en España. Consideraciones sobre su origen. *Vida Apícola* 133, 15-21.
- Higes, M., Martin, R. and Meana, A.** (2006). *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *Journal of Invertebrate Pathology* 92(2), 93-95.
- Higes, M., Garcia-Palencia, P., Martin-Hernandez, R. and Meana, A.** (2007). Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Journal of Invertebrate Pathology* 94(3), 211-217.
- Higes, M., Martin-Hernandez, R., Botias, C., Bailon, E. G., Gonzalez-Porto, A. V., Barrios, L., Del Nozal, M. J., Bernal, J. L., Jimenez, J. J., Palencia, P. G. and Meana, A.** (2008a). How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental Microbiology* 10(10), 2659-2669.
- Higes, M., Martin-Hernandez, R., Garrido-Bailon, E., Botias, C., Garcia-Palencia, P. and Meana, A.** (2008b). Regurgitated pellets of *Merops apiaster* as fomites of infective *Nosema ceranae* (Microsporidia) spores. *Environmental Microbiology* 10(5), 1374-1379.
- Higes, M., Martin-Hernandez, R., Garrido-Bailon, E., Garcia-Palencia, P. and Meana, A.** (2008c). Detection of infective *Nosema ceranae* (Microsporidia) spores in corbicular pollen of forager honeybees. *Journal of Invertebrate Pathology* 97(1), 76-78.
- Higes, M., Martin-Hernandez, R., Garcia-Palencia, P., Marin, P. and Meana, A.** (2009a). Horizontal transmission of *Nosema ceranae* (Microsporidia) from worker honeybees to queens (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology Reports* 1(6), 495-498.
- Higes, M., Martin-Hernandez, R., Garrido-Bailon, E., Botias, C. and Meana, A.** (2009b). The presence of *Nosema ceranae* (Microsporidia) in North African honey bees (*Apis mellifera intermissa*). *Journal of Apicultural Research and Bee World* 48(3), 217-219.
- Higes, M., Martin-Hernandez, R., Garrido-Bailon, E., Gonzalez-Porto, A. V., Garcia-Palencia, P., Meana, A., Del Nozal, M. J., Mayo, R., and Bernal, J. L.** (2009c). Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. *Environmental Microbiology Reports* 1(2), 110-113.
- Higes, M., Garcia-Palencia, P., Botias, C., Meana, A. and Martin-Hernandez, R.** (2010a). The differential development of microsporidia infecting worker honey bee (*Apis mellifera*) at increasing incubation temperature. *Environmental Microbiology Reports* 2(6), 745-748.
- Higes, M., Martin-Hernandez, R., Martinez-Salvador, A., Garrido-Bailon, E., Gonzalez-Porto, A. V., Meana, A., Bernal, J. L., Del Nozal, M. J. and Bernal, J.** (2010b). A preliminary study of the epidemiological factors related to honey bee colony loss in Spain. *Environmental Microbiology Reports* 2(2), 243-250.
- Higes, M., Martin-Hernandez, R. and Meana, A.** (2010c). *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie* 41(3), 375-392.
- Hirt, R. P., Logsdon, J. M., Jr., Healy, B., Dorey, M. W., Doolittle, W. F. and Embley, T. M.** (1999). Microsporidia are related to Fungi: evidence from the largest subunit of RNA polymerase II and other proteins. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 96(2), 580-585.
- Hong, I. P., Woo, S. O., Choi, Y. S., Han, S. M., Kim, N. S., Kim, H. K., Han, S. H., Lee, M. Y., Lee, M. L. and Byeon, K. H.** (2011). Prevalence of *Nosema* and virus in Honey Bee (*Apis mellifera* L.) colonies on flowering period of acacia in Korea. *Mycobiology* 39(4), 317-320.
- Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. D., Johnson, K. S., Chiswell, D. J., Hudson, P. and Winter, G.** (1991). Multisubunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Research* 19(15), 4133-4137.
- Hornbeck, P., Fleisher, T. A. and Papadopoulos, N. M.** (1991). Isotype Determination of Antibodies. In *Current Protocols in Immunology*. John Wiley and Sons, Inc. (New York).
- Huang, Q., Kryger, P., Le Conte, Y. and Moritz, R. F.** (2012). Survival and immune response of drones of a *Nosemosis* tolerant honey bee strain towards *N. ceranae* infections. *Journal of Invertebrate Pathology* 109(3), 297-302.
- Huang, W.-F., Jiang, J.-H., Chen, Y.-W. and Wang, C.-H.** (2007). A *Nosema ceranae* isolate from the honeybee *Apis mellifera*. *Apidologie* 38(1), 30-37.

- Huang, W. F., Bocquet, M., Lee, K. C., Sung, I. H., Jiang, J. H., Chen, Y. W. and Wang, C. H. (2008). The comparison of rDNA spacer regions of *Nosema ceranae* isolates from different hosts and locations. *Journal of Invertebrate Pathology* 97(1), 9-13.
- Hudson, L. and Hay, F. C. (1980). Immunchemical protocols. In *Practical Immunology*. Second Edition. Blackwell Scientific Publications Inc. (Boston).
- Ignatius, R., Lehmann, M., Miksits, K., Regnath, T., Arvand, M., Engelmann, E., Futh, U., Hahn, H. and Wagner, J. (1997). A new acid-fast trichrome stain for simultaneous detection of *Cryptosporidium parvum* and microsporidial species in stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 35(2), 446-449.
- Imdorf, A., Charrière, J. D. and Gallman, P. (2006). Mögliche Ursachen Für die Völkeverluste der letzten Jahre. *Schweizerische Bienen-Zeitung* 129, 6-10.
- Invernizzi, C., Abud, C., Tomasco, I. H., Harriet, J., Ramallo, G., Campa, J., Katz, H., Gardiol, G. and Mendoza, Y. (2009). Presence of *Nosema ceranae* in honeybees (*Apis mellifera*) in Uruguay. *Journal of Invertebrate Pathology* 101(2), 150-153.
- Issi, I. V. (1986). Microsporidia as a phylum of parasitic protozoa. *Academy of Science of the USSR* 10, 6-136.
- Izquierdo, F. (2007). Microsporidiosis: Estudio en hospedadores animales próximos al hombre. Desarrollo, producción y caracterización de anticuerpos monoclonales. Tesis Doctoral. Departamento de Biología Celular, Bioquímica y Biología molecular. USP-CEU.
- Janeway, C., Travers, P., Walpor, M. and Shlomchik, M. (2000). *Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad*. Ediciones Masson S.A. (Barcelona).
- Jordan, C. N., Zajac, A. M., Snowden, K. S. and Lindsay, D. S. (2006). Direct agglutination test for *Encephalitozoon cuniculi*. *Veterinary Parasitology* 135(3-4), 235-240.
- Katinka, M. D., Duprat, S., Cornillot, E., Metenier, G., Thomarat, F., Prensier, G., Barbe, V., Peyretailade, E., Brottier, P., Wincker, P., et al. (2001). Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature* 414(6862), 450-453.
- Katznelson, H. and Jamieson, C. A. (1952). Control of nosema disease of honeybees with fumagillin. *Science* 115(2977), 70-71.
- Katzwinkel-Wladarsch, S., Deplazes, P., Weber, R., Loscher, T. and Rinder, H. (1997). Comparison of polymerase chain reaction with light microscopy for detection of microsporidia in clinical specimens. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 16(1), 7-10.
- Katzwinkel-Wladarsch, S., Lieb, M., Helse, W., Loscher, T. and Rinder, H. (1996). Direct amplification and species determination of microsporidian DNA from stool specimens. *Tropical Medicine and International Health* 1(3), 373-378.
- Kearney, J. F., Radbruch, A., Liesegang, B. and Rajewsky, K. (1979). A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. *The Journal of Immunology* 123(4), 1548-1550.
- Keeling, P. J., Fast, N. M., Law, J. S., Williams, B. A. and Slamovits, C. H. (2005). Comparative genomics of microsporidia. *Folia Parasitologica* 52(1-2), 8-14.
- Keohane, E.M., Takvorian, P. M., Cali, A., Tanowitz, H. B., Wittner, M. and Weiss, L. M. (1994). The identification and characterization of a polar tube reactive monoclonal antibody. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 41(s5), 48S.
- Keohane, E. M., Takvorian, P. M., Cali, A., Tanowitz, H. B., Wittner, M. and Weiss, L. M. (1996). Identification of a microsporidian polar tube protein reactive monoclonal antibody. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 43(1), 26-31.
- Keohane, E. M., Takvorian, P. M., Cali, A., Tanowitz, H. B., Wittner, M. and Weiss, L. M. (2001). Monoclonal antibodies to cytoplasmic antigens of *Nosema locustae* (Microsporidia: Nosematidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 77(1), 81-82.
- Kim, S. J., Park, Y. and Hong, H. J. (2005). Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies. *Molecules and Cells* 20(1), 17-29.
- Klee, J., Besana, A. M., Genersch, E., Gisder, S., Nanetti, A., Tam, D. Q., Chinh, T. X., Puerta, F., Ruz, J. M., Kryger, P., et al. (2007). Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology* 96(1), 1-10.



- Klein, A. M., Vaissiere, B. E., Cane, J. H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. A., Kremen, C. and Tscharntke, T.** (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 274(1608), 303-313.
- Knoblett, J. N. and Youssef, N. N.** (1996). Detection of *Nosema locustae* (Microsporidia:Nosematidae) in frozen grasshoppers (Orthoptera:Acrididae) by using monoclonal antibodies. *Journal of Economic Entomology* 89(4), 841-847.
- Knudsen, G. M. and Chalkley, R. J.** (2011). The effect of using an inappropriate protein database for proteomic data analysis. *PLoS One* 6(6): e20873.
- Kock, N. P., Petersen, H., Fenner, T., Sobottka, I., Schmetz, C., Deplazes, P., Pieniazek, N. J., Albrecht, H. and Schottelius, J.** (1997). Species-specific identification of microsporidia in stool and intestinal biopsy specimens by the polymerase chain reaction. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 16(5), 369-376.
- Köhler, G. and Milstein, C.** (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256(5517), 495-497.
- Köhler, G. and Milstein, C.** (1976). Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *European Journal of Immunology* 6(7), 511-519.
- Korpela, S.** (1999). Varroapunkin resistenssiä Apistanille Suomessa – haste mehiläishoita-jille, neubonnalle ja tutkimukselle. *Mehiläinen* 16, 42-46.
- Korpela, S.** (2002). Honey bee tracheal mite in Finland: population dynamics, natural transmission between apiaries and impacts of introduction bee trade. In *Bees without frontiers: proceedings of the 6th European bee conference in Cardiff 2002* (pp. 66-72). Cardiff, Wales, UK.
- Kralj, J., Brockmann, A., Fuchs, S. and Tautz, J.** (2007). The parasitic mite *Varroa destructor* affects non-associative learning in honey bee foragers, *Apis mellifera* L. *Journal of comparative physiology. A, Neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology* 193(3), 363-370.
- Kreitman, R. J.** (2006). Immunotoxins for targeted cancer therapy. *AAPS Journals* 8(3), E532-E551.
- Kucerova, Z., Moura, H., Leitch, G. J., Sriram, R., Bern, C., Kawai, V., Vargas, D., Gilman, R. H., Ticona, E., Vivar, A. and Visvesvara, G. S.** (2004). Purification of *Enterocytozoon bieneusi* spores from stool specimens by gradient and cell sorting techniques. *Journal of Clinical Microbiology* 42(7), 3256-3261.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259), 680-685.
- Larsson, R.** (1986). Ultrastructure, function and classification of *Microsporidia*. *Progress in Protistology* 1, 325-390.
- Lernhardt, W., Andersson, J., Coutinho, A. and Melchers, F.** (1978). Cloning of murine transformed cell lines in suspension culture with efficiencies near 100%. *Experimental Cell Research* 111(2), 309-316.
- Levy, R., Dilley, J. and Lampson, L. A.** (1978). Human normal and leukemia cell surface antigens. Mouse monoclonal antibodies as probes. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 81, 164-169.
- Li, Y., Liu, H., Wu, Z., Pan, G., Xie, L., Wu, S. and Zhou, Z.** (2007). Preparation and identification of monoclonal antibodies against *Nosema bombycis*. *Science Sericulture* 33, 138-141.
- Li, Y., Wu, Z., Pan, G., He, W., Zhang, R., Hu, J. and Zhou, Z.** (2009). Identification of a novel spore wall protein (SWP26) from microsporidia *Nosema bombycis*. *International Journal of Parasitology* 39(4), 391-398.
- Littlefield, J. W.** (1964). Selection of hybrids from mantings of fibroblast in vitro and their presumed recombinants. *Science* 145(3633), 709-710.
- Lovborg, V.** (1982). *Monoclonal antibodies: production and maintenance*. William Heinemann Medical Books (London).
- Lucy, J. A.** (1978). Mechanism of chemically induced cell fusion. In *Membrane fusion*. North-Holland Publishing Co. (Amsterdam).
- Lujan, H. D., Conrad, J. T., Clark, C. G., Touz, M. C., Delbac, F., Vivares, C. P., and Nash, T. E.** (1998). Detection of microsporidia spore-specific antigens by monoclonal antibodies. *Hybridoma* 17(3), 237-243.

- Maistrello, L., Lodesani, M., Costa, C., Leonardi, F., Marani, G., Caldon, M., Mutinelli, F., and Granato, A.** (2008). Screening of natural compounds for the control of nosema disease in honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie* 39(4), 436-445.
- Malone, L., Anne, and Stefanovic, D.** (1999). Comparison of the responses of two races of honeybees to infection with *Nosema apis* Zander. *Apidologie* 30(5), 375-382.
- Martin-Hernandez, R., Meana, A., Prieto, L., Salvador, A. M., Garrido-Bailon, E. and Higes, M.** (2007). Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Applied and Environmental Microbiology* 73(20), 6331-6338.
- Martin-Hernandez, R., Meana, A., Garcia-Palencia, P., Marin, P., Botias, C., Garrido-Bailon, E., Barrios, L. and Higes, M.** (2009). Effect of temperature on the biotic potential of honeybee microsporidia. *Applied and Environmental Microbiology* 75(8), 2554-2557.
- Martin-Hernandez, R., Botias, C., Barrios, L., Martinez-Salvador, A., Meana, A., Mayack, C., and Higes, M.** (2011). Comparison of the energetic stress associated with experimental *Nosema ceranae* and *Nosema apis* infection of honeybees (*Apis mellifera*). *Parasitology Research* 109(3), 605-612.
- Martinez Fernandez, A. R.** (1995). *Microsporidios: protistas parásitos, nuevos patógenos humanos*. Real Academia de Farmacia. Instituto de España. (Madrid).
- Martinez, J., Leal, G. and Conget, P.** (2012). *Nosema ceranae* an emergent pathogen of *Apis mellifera* in Chile. *Parasitology Research* 111(2), 601-607.
- Mayack, C. and Naug, D.** (2009). Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *Journal of Invertebrate Pathology* 100(3), 185-188.
- Mayack, C. and Naug, D.** (2010). Parasitic infection leads to decline in hemolymph sugar levels in honeybee foragers. *Journal of Insect Physiology* 56(11), 1572-1575.
- McCarron, P. A., Olwill, S. A., Marouf, W. M., Buick, R. J., Walker, B. and Scott, C. J.** (2005). Antibody Conjugates and Therapeutic Strategies. *Molecular Interventions* 5(6), 368-380.
- Meana, A., Martin-Hernandez, R., and Higes, M.** (2010). The reliability of spore counts to diagnose *Nosema ceranae* infections in honey bees. *Journal of Apicultural Research* 49(2), 212-214.
- Medici, S. K., Sarlo, E. G., Porrini, M. P., Braunstein, M. and Eguaras, M. J.** (2012). Genetic variation and widespread dispersal of *Nosema ceranae* in *Apis mellifera* apiaries from Argentina. *Parasitology Research* 110(2), 859-864.
- Menotti, J., Cassinat, B., Sarfati, C., Liguory, O., Derouin, F. and Molina, J. M.** (2003). Development of a real-time PCR assay for quantitative detection of *Encephalitozoon intestinalis* DNA. *Journal of Clinical Microbiology* 41(4), 1410-1413.
- Mercer, W. E. and Schlegel, R. A.** (1979). Phytohemagglutinin enhancement of cell fusion reduces polyethylene glycol cytotoxicity. *Experimental Cell Research* 120(2), 417-421.
- Mo, L. and Drancourt, M.** (2002). Antigenic diversity of *Encephalitozoon hellem* demonstrated by subspecies-specific monoclonal antibodies. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 49(3), 249-254.
- Mo, L. and Drancourt, M.** (2004). Monoclonal antibodies for specific detection of *Encephalitozoon cuniculi*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 11(6), 1060-1063.
- Molina, J. M., Tourneur, M., Sarfati, C., Chevret, S., de Gouvello, A., Gobert, J. G., Balkan, S. and Derouin, F.** (2002). Fumagillin treatment of intestinal microsporidiosis. *The New England Journal of Medicine* 346(25), 1963-1969.
- Molinero, L. M.** (2002). Valoración de pruebas diagnósticas [en línea]. Disponible en <http://www.seh-lilha.org/pdiagnos.htm> [Consultado el 23 de enero de 2014].
- Morimoto, T., Kojima, Y., Toki, T., Komeda, Y., Yoshiyama, M., Kimura, K., Nirasawa, K. and Kadowaki, T.** (2011). The habitat disruption induces immune-suppression and oxidative stress in honey bees. *Ecology and Evolution* 1(2), 201-217.
- Morse, R. A. and Flottum, K.** (1997). *Honey bee pests, predators and diseases*. A.I. Root Company. (Medina).
- Moss, D. M., Croppo, G. P., Wallace, S. and Visvesvara, G. S.** (1999). Flow cytometric analysis of microsporidia belonging to the genus *Encephalitozoon*. *Journal of Clinical Microbiology* 37(2), 371-375.

- Moura, H., Schwartz, D. A., Bornay-Llinares, F., Sodre, F. C., Wallace, S. and Visvesvara, G. S.** (1997). A new and improved "quick-hot Gram-chromotrope" technique that differentially stains microsporidian spores in clinical samples, including paraffin-embedded tissue sections. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 121(8), 888-893.
- Moura, H., Sodre, F. C., Bornay-Llinares, F. J., Leitch, G. J., Navin, T., Wahlquist, S., Bryan, R., Meseguer, I. and Visvesvara, G. S.** (1999). Detection by an immunofluorescence test of *Encephalitozoon intestinalis* spores in routinely formalin-fixed stool samples stored at room temperature. *Journal of Clinical Microbiology* 37(7), 2317-2322.
- Nabian, S., Ahmadi, K., Nazem Shirazi, M. and Gerami Sadeghian, A.** (2011). First Detection of *Nosema ceranae*, a microsporidian protozoa of European honeybees (*Apis mellifera*) in Iran. *Iranian Journal of Parasitology* 6(3), 89-95.
- Nageli, K. W.** (1857). *Nosema bombycis* Nageli. *Botanische Zeitung* 15, 760-761.
- NAP** National Academy of Sciences. (1999). Monoclonal Antibody Production [en línea]. Disponible en: <http://grants.nih.gov/grants/policy/antibodies.pdf> [Consultado el 23 de enero de 2014].
- Naug, D.** (2009). Nutritional stress due to habitat loss can explain recent oney bee colony collapses. *Biological Conservation* 142(10), 2369-2372.
- Niederkorn, J. Y., Shadduck, J. A. and Weidner, E.** (1980). Antigen cross reactivity among different microsporidian spores as determined by immunofluorescence. *Journal of Parasitology* 66(4), 675-677.
- Norwood, T. H. and Zeigler, C. J.** (1982). The use of DMSO in mammalian cell fusion. In *Techniques in Somatic Cell Genetics*. Plenum Press (New York).
- Oi, V. T. and Herzenberg, L. A.** (1980). Immunoglobulin-producing hybrid cell lines. In *Selected methods in celular Immunology*. Freeman & Co. (San Francisco).
- OIE** Office International des Epizooties. (2008). Manual de la OIE sobre animales terrestres. Nosemosis de las abejas melíferas [en línea]. Disponible en: [http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf\\_es/2.9.04\\_Nosemosis\\_de\\_las\\_abejas.pdf](http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es/2.9.04_Nosemosis_de_las_abejas.pdf) [Consultado el 23 de enero de 2014].
- Olsson, L. and Kaplan, H. S.** (1980). Human-human hybridomas producing monoclonal antibodies of predefined antigenic specificity. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 77(9), 5429-5431.
- Ombrouck, C., Romestand, B., da Costa, J. M., Desportes-Livage, I., Datry, A., Coste, F., Bouix, G. and Gentilini, M.** (1995). Use of cross-reactive antigens of the microsporidian *Glugea atherinae* for the possible detection of *Enterocytozoon bieneusi* by western blot. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 52(1), 89-93.
- Ombrouck, C., Ciceron, L., Biligui, S., Brown, S., Marechal, P., van Gool, T., Datry, A., Danis, M. and Desportes-Livage, I.** (1997). Specific PCR assay for direct detection of intestinal microsporidia *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon intestinalis* in fecal specimens from human immunodeficiency virus-infected patients. *Journal of Clinical Microbiology* 35(3), 652-655.
- Omura, M., Furuya, K., Kudo, S., Sugiura, W. and Azuma, H.** (2007). Detecting immunoglobulin M antibodies against microsporidian *Encephalitozoon cuniculi* polar tubes in sera from healthy and human immunodeficiency virus-infected persons in Japan. *Clinical and Vaccine Immunology* 14(2), 168-172.
- Paldi, N., Glick, E., Oliva, M., Zilberberg, Y., Aubin, L., Pettis, J., Chen, Y. and Evans, J. D.** (2010). Effective gene silencing in a microsporidian parasite associated with honeybee (*Apis mellifera*) colony declines. *Applied and Environmental Microbiology* 76(17), 5960-5964.
- Parks, D. R., Bryan, V. M., Oi, V. T. and Herzenberg, L. A.** (1979). Antigen-specific identification and cloning of hybridomas with a fluorescence-activated cell sorter. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 76(4), 1962-1966.
- Paxton, R., J., Klee, J., Korpela, S. and Fries, I.** (2007). *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidologie* 38(6), 558-565.
- Peterson, N., Liu, J. A. and Shadduck, J.** (1988). *Encephalitozoon cuniculi*: quantitation of parasites and evaluation of viability. *The Journal of Protozoology* 35(3), 430-434.
- Pettis, J. S., vanEngelsdorp, D., Johnson, J. and Dively, G.** (2012). Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*. *Naturwissenschaften* 99(2), 153-158.

- Peuvel-Fanget, I., Polonais, V., Brosseau, D., Texier, C., Kuhn, L., Peyret, P., Vivares, C. and Delbac, F.** (2006). EnP1 and EnP2, two proteins associated with the *Encephalitozoon cuniculi* endospore, the chitin-rich inner layer of the microsporidian spore wall. *International Journal of Parasitology* 36(3), 309-318.
- Plischuk, S., Martín-Hernández, R., Prieto, L., Lucía, M., Botas, C., Meana, A., Abrahamovich, A. H., Lange, C. and Higes, M.** (2009). South American native bumblebees (Hymenoptera: Apidae) infected by *Nosema ceranae* (Microsporidia), an emerging pathogen of honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology Reports* 1(2), 131-135.
- Pomport-Castillon, C., Gasc, C. and Romestand, B.** (1997). Development, characterization and future prospects of monoclonal antibodies against spores of *Glugea atherinae* (protozoa-microsporidia-fish parasites). *Journal of Eukaryotic Microbiology* 44(6), 643-648.
- Pontecorvo, G.** (1975). Production of mammalian somatic cell hybrids by means of polyethylene glycol treatment. *Somatic Cell and Molecular Genetics* 1(4), 397-400.
- Porini, M. P., Audisio, M. C., Sabate, D. C., Ibarguren, C., Medici, S. K., Sarlo, E. G., Garrido, P. M. and Eguaras, M. J.** (2010). Effect of bacterial metabolites on microsporidian *Nosema ceranae* and on its host *Apis mellifera*. *Parasitology Research* 107(2), 381-388.
- Prete, M., Perosa, F., Favoino, E. and Dammacco, F.** (2005). Biological therapy with monoclonal antibodies: a novel treatment approach to autoimmune disease. *Clinical and Experimental Medicine* 5(4), 141-160.
- Prigneau, O., Achbarou, A., Bouladoux, N., Mazier, D. and Desportes-Livage, I.** (2000). Identification of proteins in *Encephalitozoon intestinalis*, a microsporidian pathogen of immunocompromised humans: an immunoblotting and immunocytochemical study. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 47(1), 48-56.
- Raschke, W. C.** (1980). Plasmacytomas, lymphomas and hybridomas: their contribution to immunology and molecular biology. *Biochimica et Biophysica Acta* 605(1), 113-145.
- Reetz, J., Nockler, K., Reckinger, S., Vargas, M. M., Weiske, W. and Broglia, A.** (2009). Identification of *Encephalitozoon cuniculi* genotype III and two novel genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* in swine. *Parasitology International* 58(3), 285-292.
- Rice, R. N.** (2001). *Nosema* disease in honeybees. Genetic variation and control. A report for the Rural Industries Research and Development Corporation [en línea]. Disponible en: <http://citeserx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.87.5669&rep=rep1&type=pdf> [Consultado el 23 de enero de 2014].
- Ruiz, O., García, E., Gago, I. and González, V.** (2005). *Plantas biofactoría: Informe de Vigilancia Tecnológica*. Genoma España (Madrid).
- Ruiz, G., Moreno, M., Lopez, M. and Vega, M.** (2007). *Anticuerpos monoclonales terapéuticos: Informe de Vigilancia Tecnológica*. Genoma España (Madrid).
- Runckel, C., Flenniken, M. L., Engel, J. C., Ruby, J. G., Ganem, D., Andino, R. and DeRisi, J. L.** (2011). Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, *Nosema* and *Criethidia*. *PLoS One* 6(6): e20656.
- Ryan, N. J., Sutherland, G., Coughlan, K., Globan, M., Doultree, J., Marshall, J., Baird, R. W., Pedersen, J. and Dwyer, B.** (1993). A new trichrome-blue stain for detection of microsporidian species in urine, stool, and nasopharyngeal specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 31(12), 3264-3269.
- Sagastume, S., del Aguila, C., Martín-Hernández, R., Higes, M. and Henriques-Gil, N.** (2011). Polymorphism and recombination for rDNA in the putatively asexual microsporidian *Nosema ceranae*, a pathogen of honeybees. *Environmental Microbiology* 13(1), 84-95.
- Sak, B., Sakova, K., Ditrach, O.** (2004). Effects of a novel anti-exospore monoclonal antibody on microsporidian development *in vitro*. *Parasitology Research*; 92(1), 74-80.
- Sak, B., Salát, J., Horka, H., Sakova, K. and Ditrach, O.** (2006). Antibodies enhance the protective effect of CD4+ T lymphocytes in SCID mice perorally infected with *Encephalitozoon cuniculi*. *Parasite Immunology* 28(3), 95-99.
- Salát, J., Jelínek, J., Chmelař, J. and Kopecký, J.** (2008). Efficacy of gamma interferon and specific antibody for treatment of microsporidiosis caused by *Encephalitozoon cuniculi* in SCID mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52(6), 2169-2174.
- Samsinak, K. and Haragsim, O.** (1972). The mite *Varroa jacobsoni* imported into Europe. *Vcelarstvi* 25, 268-269.

- Sanford, M. T.** (2001). Introduction, spread and economic impact of mites in North America. In *Mites of the honey bee*. Dadant and Sons (Hamilton).
- Sanfillana-Hayat, M., Sarfati, C., Fournier, S., Chau, F., Porcher, R., Molina, J. M. and Derouin, F.** (2002). Effects of chemical and physical agents on viability and infectivity of *Encephalitozoon intestinalis* determined by cell culture and flow cytometry. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46(6), 2049-2051.
- Sarlo, E., Medici, S. K., Braunstein, M. and Eguaras, M.** (2008). Presencia y distribución de *Nosema ceranae* en la región sudeste de la Provincia de Buenos Aires. In *Actas del Segundo Congreso Argentino de Apicultura* (p. 26). Mar de la Plata, Argentina.
- Schneiderman, S., Farber, J. L. and Baserga, R.** (1979). A simple method for decreasing the toxicity of polyethylene glycol in mammalian cell hybridization. *Somatic Cell and Molecular Genetics* 5(2), 263-269.
- Schulman, M., Wilde, C. D. and Köhler, G.** (1978). A better cell line for making hybridoma secreting specific antibodies. *Nature* 276(5685), 269-270.
- Schwartz, D. A., Bryan, R. T., Hewan-Lowe, K. O., Visvesvara, G. S., Weber, R., Cali, A. and Angriff, P.** (1992). Disseminated microsporidiosis (*Encephalitozoon hellem*) and acquired immunodeficiency syndrome. Autopsy evidence for respiratory acquisition. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 116(6), 660-668.
- Shadduck, J. A., and Pakes, S. P.** (1971). Encephalitozoonosis (nosematosis) and toxoplasmosis. *American Journal of Pathol* 64(3), 657-672.
- Shadduck, J. A.** (1989). Human microsporidiosis and AIDS. *Reviews of Infectious Diseases* 11(2), 203-207.
- Shadduck, J. A. and Greeley, E.** (1989). Microsporidia and human infections. *Clinical Microbiology Reviews* 2(2), 158-165.
- Shadduck, J., Meccoli, R. A., Davis, R. M. and Font, R. L.** (1990). Isolation of a microsporidium from a human patient. *Journal of Infectious Diseases* 162(3), 773-776.
- Shafer, A. B., Williams, G. R., Shuttler, D., Rogers, R. E., and Stewart, D. T.** (2009). Cophylogeny of *Nosema* (Microsporidia: Nosematidae) and bees (Hymenoptera: Apidae) suggests both cospeciation and a host-switch. *Journal of Parasitology* 95(1), 198-203.
- Shamim, M., Ghosh, D., Baig, M., Nataraju, B., Datta, R. K. and Gupta, S. K.** (1997). Production of monoclonal antibodies against *Nosema bombycis* and their utility for detection of pebrine infection in *Bombyx mori* L. *Journal of Immunoassay* 18(4), 357-370.
- Sharkey, R. M. and Goldenberg, D. M.** (2006). Targeted therapy of cancer: new prospects for antibodies and immunoconjugates. *A Cancer Journal for Clinicians* 56(4), 226-243.
- Sheoran, A. S., Feng, X., Kitaka, S., Green, L., Pearson, C., Didier, E. S., Chapman, S., Tumwine, J. K. and Tzipori, S.** (2005a). Purification of *Enterocytozoon bienersi* from stools and production of specific antibodies. *Journal of Clinical Microbiology* 43(1), 387-392.
- Sheoran, A. S., Feng, X., Singh, I., Chapman-Bonfiglio, S., Kitaka, S., Hanawalt, J., Nunnari, J., Mansfield, K., Tumwine, J. K. and Tzipori, S.** (2005b). Monoclonal antibodies against *Enterocytozoon bienersi* of human origin. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 12(9), 1109-1113.
- Silveira, H. and Canning, E.** (1995). *Vittaforma corneae* n. comb. for the human microsporidium *Nosema corneum* Shadduck, Meccoli, Davis & Font, 1990, based on its ultrastructure in the liver of experimentally infected athymic mice. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 42(2), 158-165.
- Singh, Y.** (1975). *Nosema* in Indian honey bee (*Apis cerana indica*). *American Bee Journal* 115, 59.
- Smart, M. D. and Sheppard, W. S.** (2012). *Nosema ceranae* in age cohorts of the western honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology* 109(1), 148-151.
- Smith, J., Kontermann, R. E., Embleton, J., and Kumar, S.** (2005). Antibody phage display technologies with special reference to angiogenesis. *The FASEB Journal* 19(3), 331-341.
- Smith, M. L.** (2012). The Honey bee parasite *Nosema ceranae*: transmissible via food exchange? *PLoS One* 7(8): e43319.
- Sobottka, I., Iglauder, F., Schuler, T., Schmetz, C., Visvesvara, G. S., Albrecht, H., Schwartz, D. A., Pieniazek, N. J., Bartscht, K., Laufs, R. and Schottelius, J.** (2001). Acute and long-term humoral immunity following active immunization of rabbits with inactivated spores of various *Encephalitozoon* species. *Parasitology Research* 87(1), 1-6.

- Sodré, F. C., Moura, H., Wahlquist, S., Bornay-Llinares, F. J. and Visvesvara, G. S.** (1997). An immunofluorescent (IF) test detects *Encephalitozoon intestinalis* spores in stool samples. In Abstracts of the 97<sup>th</sup> General Meeting of the American Society for Microbiology (Abstr. C-225, p. 159). Miami, Florida, USA.
- Sorel, N., Guillot, E., Thellier, M., Accoceberry, I., Datry, A., Mesnard-Rouiller, L. and Miegeville, M.** (2003). Development of an immunomagnetic separation-polymerase chain reaction (IMS-PCR) assay specific for *Enterocytozoon bieneusi* in water samples. *Journal of Applied Microbiology* 94(2), 273-279.
- Southern, T. R., Jolly, C. E., Lester, M. E. and Hayman, J. R.** (2007). EnP1, a microsporidian spore wall protein that enables spores to adhere to and infect host cells in vitro. *Eukaryotic Cell* 6(8), 1354-1362.
- Sprague, V. and Vabra, J.** (1977). Systematics of the microsporidia. In *Comparative Pathobiology* Vol. 2. Plenum Press (New York).
- Stahli, C., Staehelin, T., Miggiano, V., Schmidt, J. and Haring, P.** (1980). High frequencies of antigen-specific hybridomas: dependence on immunization parameters and prediction by spleen cell analysis. *Journal of Immunological Methods* 32(3), 297-304.
- Stevanovic, J., Stanimirovic, Z., Genersch, E., Kovacevic, S. R., Ljubenkovic, J., Radakovic, M., and Aleksic, N.** (2011). Dominance of *Nosema ceranae* in honey bees in the Balkan countries in the absence of symptoms of colony collapse disorder. *Apidologie* 42(1), 49-58.
- Stokstad, E.** (2007). Entomology. The case of the empty hives. *Science* 316(5827), 970-972.
- Strange, J. P. and Calderone, N. W.** (2009). Evaluation of apicultural characteristics of first-year colonies initiated from packaged Honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology* 102(2), 485-492.
- Sulaiman, I. M., Fayer, R., Lal, A. A., Trout, J. M., Schaefer, F. W., 3rd and Xiao, L.** (2003). Molecular characterization of microsporidia indicates that wild mammals Harbor host-adapted *Enterocytozoon* spp. as well as human-pathogenic *Enterocytozoon bieneusi*. *Applied and Environmental Microbiology* 69(8), 4495-4501.
- Sulaiman, I. M., Fayer, R., Yang, C., Santin, M., Matos, O. and Xiao, L.** (2004). Molecular characterization of *Enterocytozoon bieneusi* in cattle indicates that only some isolates have zoonotic potential. *Parasitology Research* 92(4), 328-334.
- Suwannapong, G., Yemor, T., Boonpakdee, C. and Benbow, M. E.** (2011). *Nosema ceranae*, a new parasite in Thai honeybees. *Journal of Invertebrate Pathology* 106(2), 236-241.
- Tapaszti, Z., Forgach, P., Kovago, C., Bekesi, L., Bakonyi, T. and Rusvai, M.** (2009). First detection and dominance of *Nosema ceranae* in Hungarian honeybee colonies. *Acta Vet Hungarica* 57(3), 383-388.
- Texier, C., Brosseau, D., El Alaoui, H., Metenier, G. and Vivares, C. P.** (2005). Post-genomics of microsporidia, with emphasis on a model of minimal eukaryotic proteome: a review. *Folia Parasitologica* 52(1-2), 15-22.
- Texier, C., Vidau, C., Vignes, B., El Alaoui, H. and Delbac, F.** (2010). *Microsporidia*: a model for minimal parasite-host interactions. *Current Opinions in Microbiology* 13(4), 443-449.
- Thellier, M., Biligui, S., Desportes-Livage, I., Accoceberry, I. and Datry, A.** (2001). Monoclonal antibody enabling the diagnosis of *Encephalitozoon intestinalis* in fecal specimens: importance of the mode of selection of hybridomas. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 48, (s1), 71S-72S.
- Tokarz, R., Firth, C., Street, C., Cox-Foster, D. L. and Lipkin, W. I.** (2011). Lack of evidence for an association between Iridovirus and colony collapse disorder. *PLoS One* 6(6): e21844.
- Traver, B. E., and Fell, R. D.** (2011a). *Nosema ceranae* in drone honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology* 107(3), 234-236.
- Traver, B. E. and Fell, R. D.** (2011b). Prevalence and infection intensity of *Nosema* in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies in Virginia. *Journal of Invertebrate Pathology* 107(1), 43-49.
- Traver, B. E. and Fell, R. D.** (2012). Low natural levels of *Nosema ceranae* in *Apis mellifera* queens. *Journal of Invertebrate Pathology* 110(3), 408-410.
- Tung, A. S.** (1983). Production of large amounts of antibodies, nonspecific immunoglobulins, and other serum proteins in ascitic fluids of individual mice and guinea pigs. *Methods in Enzymology* 93, 12-23.

- Underwood, R. M. and Currie, R. W.** (2009). Indoor winter fumigation with formic acid for control of *Acarapis woodi* (Acari: Tarsonemidae) and nosema disease, *Nosema* sp. *Journal of Economic Entomology* 102(5), 1729-1736.
- Vabra, J.** (1977). Development of the *Microsporidia*. In *Comparative Pathobiology* Vol. 1. Plenum Press (New York).
- Valera, F., Martín-Hernández, R. and Higes, M.** (2011). Evaluation of large-scale dissemination of *Nosema ceranae* spores by European bee-eaters *Merops apiaster*. *Environmental Microbiology Reports* 3(1), 47-53.
- Van Droogenbroeck, B., Cao, J., Stadlmann, J., Altmann, F., Colanesi, S., Hillmer, S., Robinson, D. G., Van Lerberge, E., Terryn, N., Van Montagu, M., et al.** (2007). Aberrant localization and underglycosylation of highly accumulating single-chain Fv-Fc antibodies in transgenic *Arabidopsis* seeds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(4), 1430-1435.
- Vavra, J. and Undeen, A. H.** (1970). *Nosema algerae*, n. sp. (*Cnidospora*, *Microsporidia*) a pathogen in a laboratory colony of *Anopheles stephensi* Liston (*Diptera*, *Culicidae*). *Journal of Protozoology* 17(2), 240-249.
- Velasquez, J. N., Carnevale, S., Guarnera, E. A., Labbe, J. H., Chertcoff, A., Cabrera, M. G. and Rodríguez, M. I.** (1996). Detection of the microsporidian parasite *Enterocytozoon bieneusi* in specimens from patients with AIDS by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 34(12), 3230-3232.
- Vidal, X. H., Perez, M. I. S., Fernandez, E. V., Salgado, C. C., Elizondo, E. L. and Ayçaguer, L. C. S.** (2004). EPIDAT 3.0. Programa para análisis epidemiológico de datos tabulados. *Revista Española de Salud Pública* 78(2), 277-280.
- Vidau, C., Diogon, M., Aufauvre, J., Fontbonne, R., Vignes, B., Brunet, J. L., Texier, C., Biron, D. G., Blot, N., El Alaoui, H., et al.** (2011). Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. *PLoS One* 6(6): e21550.
- Visvesvara, G. S., Leitch, G. J., Moura, H., Wallace, S., Weber, R. and Bryan, R. T.** (1991). Culture, electron microscopy, and immunoblot studies on a microsporidian parasite isolated from the urine of a patient with AIDS. *Journal of Protozoology* 38(s6), 105S-111S.
- Visvesvara, G. S., Leitch, G. J., da Silva, A. J., Croppo, G. P., Moura, H., Wallace, S., Slemenda, S. B., Schwartz, D. A., Moss, D., Bryan, R. T., and et al.** (1994). Polyclonal and monoclonal antibody and PCR-amplified small-subunit rRNA identification of a microsporidian, *Encephalitozoon hellem*, isolated from an AIDS patient with disseminated infection. *Journal of Clinical Microbiology* 32(11), 2760-2768.
- Visvesvara, G. S., da Silva, A. J., Croppo, G. P., Pieniazek, N. J., Leitch, G. J., Ferguson, D., de Moura, H., Wallace, S., Slemenda, S. B., Tyrrell, I., and et al.** (1995). In vitro culture and serologic and molecular identification of *Septata intestinalis* isolated from urine of a patient with AIDS. *Journal of Clinical Microbiology* 33(4), 930-936.
- Visvesvara, G. S.** (2002). In vitro cultivation of microsporidia of clinical importance. *Clinical Microbiology Reviews* 15(3), 401-413.
- Vossbrink, C. R., Maddox, J. V., Friedman, L. S., Debrunner - Vossbrink, B. A. and Woese, C. R.** (1987). Ribosomal RNA sequence suggests microsporidia are extremely ancient eukaryotes. *Nature* 326(6111), 411-414.
- Vossbrink, C. R. and Woese, C. R.** (1986). Eucaryotic ribosomes that lack a 5.8S RNA. *Nature* 320(6059), 287-288.
- Wang, J. Y., Chambon, C., Lu, C. D., Huang, K. W., Vivares, C. P. and Texier, C.** (2007). A proteomic-based approach for the characterization of some major structural proteins involved in host-parasite relationships from the silkworm parasite *Nosema bombycis* (*Microsporidia*). *Proteomics* 7(9), 1461-1472.
- Weber, R., Bryan, R., Owen, R., Wilcox, C. M., Gorelkin, L. and Visvesvara, G. S.** (1992). Improved light-microscopical detection of microsporidia spores in stool and duodenal aspirates. *The New England Journal of Medicine* 326(3), 161-166.
- Weber, R., Kuster, H., Visvesvara, G. S., Bryan, R. T., Schwartz, D. A. and Luthy, R.** (1993). Disseminated microsporidiosis due to *Encephalitozoon hellem*: pulmonary colonization, microhematuria, and mild conjunctivitis in a patient with AIDS. *Clinical Infectious Diseases* 17(3), 415-419.
- Weber, R., Bryan, R. T., Schwartz, D. A. and Owen, R. L.** (1994). Human microsporidial infections. *Clinical Microbiology Reviews* 7(4), 426-461.

- Weber, R., Schwartz, D. A. and Desplazes, P.** (1999). Laboratory diagnosis of microsporidiosis. In *The Microsporidia and Microsporidiosis*. ASM Press (Washington).
- Webster, T. C., Pomper, K. W., Hunt, G., Thacker, E. M. and Jones, S. C.** (2004). *Nosema apis* infection in worker and queen *Apis mellifera*. *Apidologie* 35(1), 49-54.
- Weidner, E.** (1976). The microsporidian spore invasion tube. The ultrastructure, isolation, and characterization of the protein comprising the tube. *The Journal of Cell Biology* 71(1), 23-34.
- Weidner, E., Byrd, W., Scarborough, A., Pleshinger, J. and Sibley, D.** (1984). Microsporidian spore discharge and the transfer of polaroplast organelle into plasma membrane. *Journal of Protozoology* 31(2), 195-198.
- Weidner, E.** (1991). Closing remarks on opportunistic microsporidian in humans. *Journal of Protozoology* 38, 638-641.
- Weidner, E., and Halonen, S.** (1993). Microsporidian spore envelope keratins phosphorylate and disassemble during spore activation. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 40(6), 783-788.
- Weidner, E., Canning, E. U. and Hollister, W. S.** (1997). The plaque matrix (PQM) and tubules at the surface of intramuscular parasite, *Trachipleistophora hominis*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 44(4), 359-365.
- Weiser, J.** (1985). Phylum *Microspora* Sprage, 1969. In *An illustrated guide to the protozoa*. Wiley-Blackwell. (Lawrence).
- Weiss, L. M., Cali, A., Levee, E., LaPlace, D., Tanowitz, H., Simon, D. and Wittner, M.** (1992). Diagnosis of *Encephalitozoon cuniculi* infection by western blot and the use of cross-reactive antigens for the possible detection of microsporidiosis in humans. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 47(4), 456-462.
- Weiss, L. M. and Vossbrinck, C. R.** (1999). Molecular biology, molecular phylogeny, and molecular diagnostic approaches to the microsporidia. In *The Microsporidia and Microsporidiosis*. ASM Press (Washington).
- Westerwoudt, R. J., Naipal, A. M. and Harrisson, C. M.** (1984). Improved fusion technique. II. Stability and purity of hybrid clones. *Journal of Immunological Methods* 68(1-2), 89-101.
- Whitaker, J., Szalanski, A. L. and Kence, M.** (2011). Molecular detection of *Nosema ceranae* and *N. apis* from Turkish honey bees. *Apidologie* 42(2), 174-180.
- Williams, B. A. P. and Keeling, P. J.** (2011). Microsporidia - Highly reduced and derived relatives of Fungi. In *Evolution of Fungi and Fungal-like organisms. The Mycota XIV*. Springer-Verlag (Berlin).
- Williams, G. R., Sampson, M. A., Shutler, D., and Rogers, R. E.** (2008a). Does fumagillin control the recently detected invasive parasite *Nosema ceranae* in western honey bees (*Apis mellifera*)? *Journal of Invertebrate Pathology* 99(3), 342-344.
- Williams, G. R., Shafer, A. B., Rogers, R. E., Shutler, D. and Stewart, D. T.** (2008b). First detection of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite of European honey bees (*Apis mellifera*), in Canada and central USA. *Journal of Invertebrate Pathology* 97(2), 189-192.
- Williams, P.** (2005). Does specialisation explain rarity and decline among British bumblebees? A response to Goulson et al. *Biological Conservation* 122(1), 33-43.
- Wittner, M. and Weiss, L. M.** (1999). *The Microsporidia and Microsporidiosis*. ASM Press (Washington).
- Wolk, D. M., Schneider, S. K., Wengenack, N. L., Sloan, L. M., and Rosenblatt, J. E.** (2002). Real-time PCR method for detection of *Encephalitozoon intestinalis* from stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 40(11), 3922-3928.
- Wu, J. Y., Smart, M. D., Anelli, C. M. and Sheppard, W. S.** (2012). Honey bees (*Apis mellifera*) reared in brood combs containing high levels of pesticide residues exhibit increased susceptibility to *Nosema* (*Microsporidia*) infection. *Journal of Invertebrate Pathology* 109(3), 326-329.
- Wu, Z., Li, Y., Pan, G., Tan, X., Hu, J., Zhou, Z. and Xiang, Z.** (2008). Proteomic analysis of spore wall proteins and identification of two spore wall proteins from *Nosema bombycis* (*Microsporidia*). *Proteomics* 8(12), 2447-2461.
- Wu, Z., Li, Y., Pan, G., Zhou, Z. and Xiang, Z.** (2009). SWP25, a novel protein associated with the *Nosema bombycis* endospore. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 56(2), 113-118.
- Xu, Y. and Weiss, L. M.** (2005). The microsporidian polar tube: a highly specialised invasion organelle. *International Journal of Parasitology* 35(9), 941-953.



- Yacobson, B., Potichot, S. and Wongsisi, S.** (1992). Possible transfer of *Nosema apis* from *Apis mellifera* to *Apis cerana*. In *Proceedings of International Conference on the Asian Honey Bees and Bee mites* (p. 97). Bangkok, Thailand.
- Yelton, D. E. and Scharff, M. D.** (1981). Monoclonal antibodies: a powerful new tool in biology and medicine. *Annual Review of Biochemistry* 50, 657-680.
- Yokoyama, W. M.** (1991). Monoclonal antibody supernatant and ascites fluid production. In *Current Protocols in Immunology*. John Wiley and Sons, Inc. (New York).
- Yokoyama, W. M.** (1995). Production of monoclonal antibodies. In *Current Protocols in Immunology*. John Wiley and Sons, Inc. (New York).
- Yoshiyama, M. and Kimura, K.** (2011). Distribution of *Nosema ceranae* in the European honeybee, *Apis mellifera* in Japan. *Journal of Invertebrate Pathology* 106(2), 263-267.
- Zander, E.** (1909). Tierische parasiten als krankheitserreger bei der biene. *Münchener Bienenzeitung* 31, 196-204.
- Zhang, F., Lu, X., Kumar, V. S., Zhu, H., Chen, H., Chen, Z. and Hong, J.** (2007). Effects of a novel anti-exospore monoclonal antibody on microsporidial *Nosema bombycis* germination and reproduction in vitro. *Parasitology* 1348(Pt 11), 1551-1558.
- Zhang, Q., Singh, I., Sheoran, A., Feng, X., Nunnari, J., Carville, A. and Tzipori, S.** (2005). Production and characterization of monoclonal antibodies against *Enterocytozoon bieneusi* purified from rhesus macaques. *Infection and Immunity* 73(8), 5166-5172.
- Zierdt, C. H., Gill, V. J. and Zierdt, W. S.** (1993). Detection of microsporidian spores in clinical samples by indirect fluorescent-antibody assay using whole-cell antisera to *Encephalitozoon cuniculi* and *Encephalitozoon hellem*. *Journal of Clinical Microbiology* 31(11), 3071-3074.